ZUM ELEKTRONENTRANSPORT IN SCHWEFEL- UND SELENOPROTEINEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WALTER PILZ

aus Reichenberg

1978

ZUM ELEKTRONENTRANSPORT IN SCHWEFEL- UND SELENOPROTEINEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WALTER PILZ

aus Reichenberg

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 8. 1978

Dekan: Prof. Dr. W. Zeil

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Weser

2. Berichterstatter: Doz. Dr. A. Wendel

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Weser im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Weser, dem Leiter der Arbeitsgruppe anorg. Biochemie, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche.

Herrn Doz. A. Wendel danke ich für die wertvollen Diskussionen und die Überlassung von Glutathionperoxidaseproben, sowie den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die Durchführung von Selenanalysen.

Durch Sachbeihilfen an Herrn Prof. Weser hat die Deutsche Forschungsgemeinschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Dem Land Baden-Württemberg möchte ich für ein Promotionsstipendium im Rahmen der Graduiertenförderung danken.

Dem Direktor des Physiologisch-chemischen Institutes, Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel, sei für die Bereitstellung von Institutseinrichtungen gedankt.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Schwefel in Proteinen	1
1.1.1.	Schwefel der Oxidationsstufe -II	2
1.1.2.	Schwefel der Oxidationsstufe -I	3
1.1.3.	Schwefel der Oxidationsstufe O	4
1.1.4.	Schwefel der Oxidationsstufe +I	5
1.1.5.	Schwefel in den Oxidationsstufen +II, +III, +IV, +V, +VI	5
1.1.6.	Schwefel in ungewöhnlichen Ladungszuständen	6
1.2.	Redoxprozesse, Elektronen- und Energieübertragungsreaktionen	7
1.2.1.	Oxidationsreaktionen (RSH, RSSH, RSR, RSSR, RSOH, $RSMe^+$)	7
1.2.2.	Elektronentransferreaktionen	8
1.2.3.	Energieübertragungsreaktionen	9
1.2.4.	Schwefel im katalytisch-aktiven Zentrum	9
1.3.	Selen in Proteinen	10
1.3.1.	Unspezifische Bindung des Selen an Proteine	11
1.3.2.	Selen als Schwefelersatz	11
1.3.3.	Selen in katalytischer Funktion	12
1.3.4.	Selen in katalytischer Funktion in Proteinen	12
1.3.5.	Selen und Schwermetalle	13
1.4.	Röntgenphotoelektronenspektroskopie in der Biochemie von Schwefel und Selen	14
1.5.	Engere Problematik	15

		Seite
2.	MATERIAL	18
2.1.	Chemikalien	18
2.2.	Enzyme	19
2.3.	Geräte	19
3.	METHODEN	21
3.1.	Präparate	21
3.1.1.	Anorganische Schwefelverbindungen	21
3.1.2.	Anorganische Selenverbindungen	21
3.1.3.	Selenotrisulfide	22
3.1.4.	Isolierung von Rhodanese aus Rinderleber	24
3.1.4.1.	Rohhomogenatfraktion	24
3.1.4.2.	Ammoniumsulfat-Cellit-Chromatographie	24
3.1.4.3.	Gelfiltration	25
3.1.4.4.	Umkristallisation	25
3.1.4.5.	Selen-substituierte Rhodanese	26
3.2.	Analytik	27
3.2.1.	Rhodanese-Aktivität	27
3.2.2.	Proteine	28
3.2.2.1.	Proteinbestimmungen	28
3.2.2.2.	Metalle	28
3.2.2.3.	SDS-Gelelektrophorese	29
3.2.3.	Elementaranalyse	29
3.2.4.	Elektronenabsorptionsspektroskopie	30
3.2.5.	Circulardichroismus	30

Seite

3.2.6. Röntgenphotoelektronenspektroskopie 31

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION 38

4.1. Schwefel 38

4.1.1. Anorganische Schwefelverbindungen 38

4.1.2. Modelle für gebundenen Schwefel in biologischen Systemen 43

4.1.3. Proteine 48

4.1.3.1. Cytochrom C 48

4.1.3.2. Myoglobin 51

4.1.3.3. Rhodanese 55

4.1.3.4. Papain, Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase 59

4.1.3.5. Serumalbumin 60

4.1.3.6. Thioneine 63

4.2. Selen 65

4.2.1. Anorganische Selenverbindungen 65

4.2.2. Selen-Verbindungen als Modelle von Selenoproteinen 67

4.2.3. Selenoproteine 74

4.2.3.1. Glutathionperoxidase 74

4.2.3.2. Selenometallothionein 77

4.2.4.3. Selenorhodanese 80

		Seite
5.	DISKUSSION	82
5.1.	Möglichkeiten und Grenzen der Photoelektronenspektroskopie	82
5.2.	Redoxzustände von Schwefel und Selen in Proteinen	86
5.2.1.	Zum Problem S^+ oder Sulfinsäure	87
5.2.2.	Oxidation von Schwefel mit Oxidationsmitteln	89
5.2.3.	Thiole und Selenole	89
5.2.4.	Altersbedingte Denaturierung	90
5.2.5.	Elektronentransferreaktionen	91
5.2.6.	Zur chemischen Verschiebung der N 1s, O 1s und der S 2p-Bindungsenergiewerte in Perchalkogenidverbindungen	92
6.	ZUSAMMENFASSUNG	93
7.	LITERATURVERZEICHNIS	96

Abkürzungen:

CD	=	Circulardichroismus
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
EPR	=	Electron Paramagnetic Resonance
XPS	=	X-Ray Photoelectron Spectroscopy
UV	=	Ultraviolett
EDTA	=	Äthylendiamintetraessigsäure
SDS	=	Natriumdodecylsulfat

1. EINLEITUNG

1.1. Schwefel in Proteinen

Das Vorkommen des Schwefels in biologischen Systemen ist seit langem bekannt, und ein umfangreiches Wissen über die Rolle des Schwefels als strukturelles und funktionelles Element in zahlreichen Proteinen, Enzymen und niedermolekularen Substanzen, die Schlüsselstellungen im Stoffwechsel einnehmen, hat sich akkumuliert (1,2,3,4). Von besonderem Interesse für die biochemische Reaktivität des Schwefels ist die starke Polarisierbarkeit, die große Variationsbreite der S-S Bindungslänge, die Hybridisierungsmöglichkeiten mit Hilfe der d-Orbitale und die 8 verschiedenen Oxydationsstufen. Alle diese Eigenschaften sind entscheidende Voraussetzungen für die bedeutende Rolle des Schwefels und seiner Redoxreaktionen.

Die Zuordnung des Oxidationszustands des Schwefels ist ein wertvoller Beitrag zum Verständnis der Bioenergetik auf molekularer Ebene. Eine geeignete Meßmethode für diese Fragestellung ist die Röntgenphotoelektronenspektroskopie. Sie erlaubt es, Ladungszustände des Schwefels in nativen Proteinen "in situ" anhand der Änderung der Bindungsenergie der Kernelektronen zu untersuchen. Diese lassen sich mit anderen physikalisch-chemischen Methoden, wie z.B. ESR, NMR, Mößbauer-Spektroskopie, aufgrund der nuklearen und chemischen Eigenschaften des Schwefels nicht charakterisieren.

1.1.1. Schwefel der Oxidationsstufe -II

Formal zweiwertig negativ geladener Schwefel wurde in den ubiquitär verbreiteten Ferredoxinen als Teil der 2Fe, 2S-Cluster bzw. 4Fe, 4S-Cluster gefunden (5,6). Er liegt in säurelabiler Form, tetraedrisch an Fe^{2+} bzw. Fe^{3+}-Ionen gebunden vor. In 4Fe, 4S-Ferredoxinen ergibt sich für das Eisen eine formale Wertigkeit von 2,5, dem Mittel aus $2Fe^{2+}$- und $2Fe^{3+}$-Ionen. Jedoch zeigten ESR und ^{57}Fe-Mößbaueruntersuchungen, daß die einzelnen Eisenatome nicht unterscheidbar sind und die Valenzelektronen über den Cluster delokalisiert sind. 1-Elektronenoxidation im HIPIP bzw. -reduktion im Ferredoxin führt zu EPR-aktiven Oxidationszuständen (7).

XPS-Arbeiten an Ferredoxinen deuten darauf hin, daß die Elektronentransferreaktionen nicht primär am Fe-Zentralatom ablaufen, sondern unter wesentlicher Beteiligung der sterisch exponierten S^{2-}- und/oder Thiolat-Liganden. Die acht Schwefelatome eines Clusters liegen formal in einer Oxidationsstufe von 1,5 bei einer Gesamtladung von 2- vor. XPS-Spektren zeigen jedoch eine Aufspaltung des Schwefelsignals von 1,4 - 2,0 eV, was auf einen unterschiedlichen Ladungszustand von Cysteinschwefel und/oder Sulfidschwefel von -I bzw. -II schließen läßt (8,9).

Röntgenkristallstrukturuntersuchungen geben Hinweise darauf, daß Ladungsänderungen des Fe,S-Clusters mit Änderungen der Bindungslängen zwischen dem Thiolatschwefel und dem Eisen des Clusters verbunden sind (10).

1.1.2. Schwefel der Oxidationsstufe -I

Einwertig negativ geladener Schwefel findet sich als Merkaptidschwefel in Metallothioneinen, die wegen ihres 30 %-igen Anteils an Cysteinresten 8-12 Metallbindungsstellen mit Schwermetallionen bilden, die alle sogenannten weichen Charakter nach dem Pearsonkonzept, wie z.B. Cd^{2+}, Hg^{2+}, Cu^{1+}, Zn^{2+}, (Ag^{1+}, Au^{1+}, Tl^{1+}), besitzen (11). Die Metall-Merkaptid-Bindung weist in Abhängigkeit vom Metallion unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich Stöchiometrie, Dissoziierbarkeit, Stabilität gegenüber Oxidationsmittel und Austauschreaktionen auf (12). Metallothioneine mit hohem Zinkanteil nehmen wegen der leichten Austauschbarkeit und Oxidierbarkeit eine Sonderstellung ein (13). Ebenso Kupferthionein wegen des möglichen Redoxwechsels der Kupfer-Schwefel-Bindungen (14,15).

An homogenen "in vitro" dargestellten Hg-, Cd-, Cu- und Zn-Thioneinen konnte eine Korrelation zwischen den unterschiedlichen Thiolatschwefeln und der Bindungsenergie ihrer S 2p-Elektronen gefunden werden, die Rückschlüsse auf den ionischen bis kovalenten Charakter der Merkaptidbindungen zuläßt (16,17).

Rhodanese, E.C. 2.8.1.1, (Thiosulfat-Sulfo-Transferase) in seiner Sulfan-Schwefel-beladenen Form, enthält Schwefel in der Oxidationsstufe -I als Persulfidgruppe (18,19). Diese Zuordnung wird durch eine UV-Absorption bei 330 nm, sowie Fluoreszenzquenchungsversuche gestützt (20). Röntgenstrukturanalysen ergaben das Vorliegen eines Cys-Rests im aktiven Zentrum neben 3 weiteren Thiolgruppen (21,22).

Die biologische Funktion der Rhodanese ist noch nicht geklärt; in Rekonstitutionsversuchen an Ferredoxinen konnte die Rhodanese als Sulfanschwefel-Donor erfolgreich eingesetzt werden (23). Die Persulfidgruppe ist im neutralen Bereich i.A. instabil, wird jedoch vermutlich durch die hydrophobe Umgebung und ein benachbartes kationisches Zentrum im Proteinverband stabilisiert.

1.1.3. Schwefel der Oxidationsstufe 0

Myoglobin aus Pferdemuskel, das ausschließlich Schwefel als Thioäthergruppe in 2 Methionin-Resten enthält, kann als Modellprotein dienen, um Oxidationsreaktionen an proteingebundenem Methionin zu untersuchen (25).
Auch im Cytochrom C finden sich 4 Thioäthergruppierungen, wovon 2 über Cysteinreste an das Häm gebunden sind (24). Von den 2 Methioninresten ist einer über den Schwefel als 5. Ligand an das Hämeisen gebunden, wie aus Röntgenstrukturdaten hervorgeht (26). Dieser Methioninschwefel ist vermutlich am Elektronentransfer beteiligt und in der oxydierten Form des Cytochrom C positiviert.

1.1.4. Schwefel in der Oxidationsstufe +I

Da nur wenige niedermolekulare Sulfensäureverbindungen stabil sind, wie z.B. die aromatischen Verbindungen 4-Methyluracilsulfensäure, 1-Anthrachinonsulfensäure, da sie im allgemeinen sofort zu Disulfiden weiterreagieren, wurden Sulfensäuren in Proteinen allenfalls als Intermediate postuliert, jedoch nicht als stabile Strukturen (27). In Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase E.C. 1.2.1.12 und Papain E.C. 3.4.4.10 konnte das Vorliegen von Sulfensäure aufgrund des allgemeinen chemischen Reaktionsverhaltens, insbesondere Spezifizitätsänderungen wahrscheinlich gemacht werden. Im Proteinmolekül ist die Weiterreaktion zu Disulfiden möglicherweise aus sterischen Gründen nicht immer möglich. Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase enthält 332 Aminosäuren, 1 katalytisch aktive SH-Gruppe, 3 weitere Thiole, jedoch keine Disulfidbrücken (27).

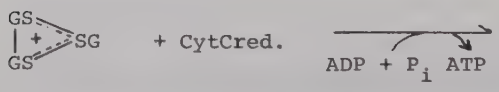
1.1.5. Schwefel in den Oxidationsstufen +II, +III, +IV +V, +VI

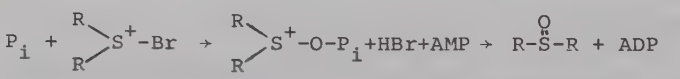
Sulfoxide, Sulfinsäure, Sulfone und Sulfonsäure finden sich i.A. als Zwischen- und Endprodukte von Oxidationsreaktionen, die Cystein, Methionin und Disulfid-Gruppen betreffen. Diese Reaktionen laufen z.T. enzymatisch katalysiert "in vivo" ab, können jedoch auch als Artefakte bei Denaturierungs- und Alterungsvorgängen entstehen. 6-wertiger Schwe-

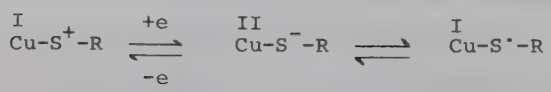
fel wird auch durch spezifische Sulfatierungsreaktionen in Proteine eingebaut (1).

1.1.6. Schwefel in ungewöhnlichen Ladungszuständen

Zusätzlich tritt Schwefel in Verbindungen auf, in denen er einen Elektronenüberschuß als S^-, eine Elektronenlücke als S^+ aufweist, sowie als radikalischer Schwefel $\cdot S^+$, ^{0} oder $^-$ vorliegt. Besonderes Interesse verdienen S^+-Verbindungen, da sie hohe chemische Verschiebungen der Bindungsenergie in XPS-Spektren aufweisen sollten. Im Stoffwechsel des Schwefels tritt S^+ in trialkylierten Verbindungen wie S-Adenosyl-Methionin, S-Dialkylthetin, Dimethylpropiothetin auf (1).
Einige hypothetische S^+-Verbindungen sind so energiereich, daß sie die ATP-Bildung katalysieren können (28,29).







S^+ liegt wahrscheinlich auch in der Cu(I)-Merkaptid-Bindung nach Oxidation mit stöchiometrischen Mengen H_2O_2 vor, wobei ein radikalischer Zwischenzustand durchlaufen wird

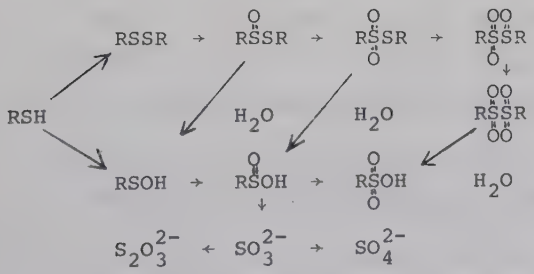
(30). Radikalischer Schwefel in stabiler, fester Form wurde in den Mineralien Ultramarin und Lapislazuli als $\cdot S_2^-$, $\cdot S_3^-$ gefunden (31,32).

1.2. Redoxprozesse, Elektronen- und Energieübertragungsreaktionen

Im folgenden sollen "in vivo" und biologisch relevante "in vitro" Redox- und Elektronentransferreaktionen exemplarisch dargestellt werden.

1.2.1. Oxidationsreaktionen (RSH, RSSH, RSR, RSSR, RSOH, $RSMe^+$)

Reaktionsschema:



Als reaktionsfähige und labile Verbindungen müssen Thiole und Sulfensäuren angesehen werden. Relativ stabil sind Disulfide, Sulfin-, Sulfon-Säuren und Sulfonate. Einer enzymatischen Oxidation bzw. Reduktion unterliegen Sulfit, Sulfoxide und Sulfinsäuren. Proteingebundener Schwefel zeigt wegen seiner besonderen sterischen und chemischen Verhältnisse oft anomale Reaktivität. Die Oxidationsreaktionen an Schwefel können radikalisch, photochemisch oder mit Oxidationsmitteln ausgelöst werden (1,3).

1.2.2. Elektronentransferreaktionen

Proteingebundener Schwefel ist an Elektronentransferreaktionen in Ferredoxinen, Metallothioneinen und Cytochrom C beteiligt.
Nach der Dreizustandshypothese von C.B. Carter kann Ferredoxin bzw. HIPIP zwischen dem C^{+}, C oder C^{-}-Zustand wechseln (33). Hierbei ist der labile Schwefel und/oder der Thiolatschwefel höchstwahrscheinlich als Elektronenakzeptor und -Donor wirksam (9). Es gibt Hinweise darauf, daß auch Kupferthioneine Redoxwechsel zeigen können, wie sich aus XPS-Untersuchungen des Thiolatschwefels ergeben hat (15).
Im Cytochrom C wird die genaue Lokalisation des Elektronentransfers in diesem Makromolekül ausgehend von der Cytochrom C-Reduktase zur Cytochrom C-Oxidase diskutiert. Man nimmt an, daß sowohl ein Tunnelmechanismus, wie auch ein

direkter Elektronentransfer über aromatische Aminosäuren und immer auch über den Methioninschwefel und den hämgebundenen Cysteinschwefel möglich ist (34).

1.2.3. Energieübertragungsreaktionen

Im Zusammenhang mit ESR-Untersuchungen wurden mehrere Hypothesen der Energieübertragung formuliert. Neben der Elektronenwanderung über N-H Wasserstoffbrückenbindungen, deren Aktivierungsenergie mit 5 eV jedoch zu hoch erscheint, wurde auch der Elektronentransport über die Peptidbindungen mit Hilfe von Hyperkonjugation über das asymmetrische C-Atom hinweg diskutiert. In ESR-Untersuchungen wurde nach Bestrahlung von Proteinen die Bildung von Schwefelradikalen beobachtet, was die Schwefelatome als natürliche Elektronenakzeptoren erscheinen läßt (35).

1.2.4. Schwefel im katalytisch-aktiven Zentrum

In einer Anzahl von Esterasen wie Papain E.C. 3.4.4.10, Bromelain E.C. 3.4.4.24 und Kathepsin E.C. 3.4.4.23 wurden Thiole als katalytisch wirksame funktionelle Reste im aktiven Zentrum identifiziert (1).
In der Rhodanese ist ein Thiolrest als Sulfanschwefel-Donor und -Akzeptor wirksam (22).

1.3. Selen in Proteinen

Noch stärker polarisierbar als der Schwefel ist das chemisch homologe Selen. Seine Rolle im biologischen Geschehen geht fraglos auf diese chemischen Eigenschaften zurück. Im Gegensatz zu Schwefel sind nur wenige biochemische selenabhängige Reaktionen bekannt.

Nachdem vor zwanzig Jahren Selen als essentielles und biologisch aktives Element von Schwartz und Foltz nachgewiesen worden war, konnte es inzwischen in einer Reihe von Enzymproteinen in stöchiometrischen Mengen gefunden werden (36). Selen ist Bestandteil des Formiatdehydrogenasekomplexes aus Clostridium thermoaceticum (37), des Protein A aus dem Glycinreduktasekomplex aus Clostridium stricklandii (38) und der Glutathionperoxidase (39), die in vielen tierischen Geweben gefunden wurde. Diese Liste ist sicher noch nicht vollständig, und es gibt Hinweise auf das Vorhandensein von Selen in einer Reihe weiterer Proteine wie dem Protein aus Lamm-Muskel mit einem MW 10000 und Lipoproteine in Meerestieren (40,41).

Auch der in vitro Einbau von Se an Stelle von S als spektroskopischer Marker gelang im Falle der Nicht-Hämeisenproteine Putidaredoxin, Adrenodoxin, Ferredoxin, sowie bei der Rhodanese und der Ribonuclease (42,43,44,45,46).

1.3.1. Unspezifische Bindung des Selen an Proteine

Se zeigt eine leicht erhöhte Bindung an die Plasmaproteine α_2-Globulin und Coeruloplasmin. Ansonsten scheint eine relativ unspezifische Bindung in allen Oxidationsstufen des verabreichten Selenits zu erfolgen (47).
Intrazellulär ist ein reduzierender Stoffwechselweg in Gegenwart eines Überschusses von Glutathion postuliert worden, der die Stufen des Selenotrisulfids und des Selenopersulfids durchläuft (48).

1.3.2. Selen als Schwefelersatz

Selenit wird bei Überschreiten einer Schwellenkonzentration, die im Bereich von 1 ppm liegt, an Stelle von Schwefel in vielen pflanzlichen und tierischen Organismen als Selenocystin und Selenomethionin eingebaut und toxische Wirkungen sind zum Teil in der Antimetabolitenrolle zum Schwefel zu verstehen. In der Regel wird ein Verhältnis von Se:S von 1:25000 gefunden. In Metallothionein konnte Selenocystin bei Fütterungsversuchen Cystein nicht ersetzen. Es zeigte sich vielmehr, daß der Selengehalt nur 1/10 des zu erwartenden Werts betrug (49). Das Ausmaß des Seleneinbaus ist sicherlich auch von der Form des angebotenen Selens abhängig.

1.3.3. Selen in katalytischer Funktion

Spuren von Selenit können die thiolkatalysierte Methylenblau-Reduktion stark beschleunigen. Als Intermediate werden Perselenidverbindungen angenommen (50).
Polyphenylselenol vermag sehr spezifisch Alkohole zu dehydratisieren und durchläuft dabei einen Wechsel von der Selenolform zur Selenenylform (51).

1.3.4. Selen in katalytischer Funktion in Proteinen

Glutathionperoxidase, welche 4 g-Atome Selen pro Molekül gebunden enthält, katalysiert die Oxidation von GSH mit Hilfe von H_2O_2 und anderen Peroxiden (52). Das Protein scheint hierbei unterschiedliche Redoxzustände zu durchlaufen. Kinetische Untersuchungen deuten darauf hin, daß das Selen direkt am katalytischen Prozeß beteiligt ist (53). Mit Hilfe von XPS-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das Selen mit den beiden Substraten H_2O_2 und Glutathion reagiert und zu unterschiedlichen Ladungszuständen des Selens führt (54). Diese Methode erlaubt jedoch keine direkte strukturelle Zuordnung. Die Meßwerte deuten auf einen Wechsel zwischen einer (-I)-wertigen Selenolform und einer (+I)-wertigen Selenensäureform hin, wobei ein Überschuß von H_2O_2 zu höheren Oxidationsstufen ≈ +IV führt, die ebenfalls am enzymatischen Geschehen beteiligt sein können.

Das Selenoprotein aus dem clostridiellen Glycinreduktase-komplex enthält neueren Arbeiten zufolge Selen in der Selenolform als Selenocystein (55,56). Die katalytische Funktion in der Gesamtreaktion von Glycin zu Acetat und NH_3 bei gleichzeitiger ATP-Bildung ist noch unbekannt. Es könnte am Elektronentransport beteiligt sein.

1.3.5. Selen und Schwermetalle

Bislang wurden keine biologisch aktiven Schwermetall-Selenid-Cluster in Analogie zu Schwefel-Eisenprotein isoliert. "In vitro" wurde bereits erfolgreich der Austausch von S^{2-} des 2Fe-2S-Ferredoxins durchgeführt. Das dabei entstandene 2Fe-2Se-Protein ist ermutigend für weiterführende Untersuchungen. Zunächst wurde die Reaktivität von Se^{2-} mit Schwermetallen verfolgt.
Ein Körperpool von Se^{2-}, aufrechterhalten durch Tocopherol und andere Antioxidantien, kann Überschüsse von Cd, Cu, Zn, As, Hg, Ag als Metallselenide in den Geweben ablagern oder ausscheiden, aber auch umverteilen und auf diesen Wegen die Toxizität gegenseitig niedrighalten.
Ag^+, (Cu, Au) können das Se-Enzym Glutathionperoxidase bei einer Konzentration von 10^{-6} M Ag hemmen. Das Ag war dabei nicht fest ans Protein gebunden. Wahrscheinlich bildet sich eine AgSe-Verbindung, die den antagonistischen Effekt von Ag gegen Se in vivo erklären könnte (57).

1.4. Röntgenphotoelektronenspektroskopie in der Biochemie von Schwefel und Selen

Bereits in den ersten Arbeiten von Siegbahn wurden die S 2p1/2 3/2 Doublettsignale von Cystin, Insulin und deren Oxidationsprodukte untersucht (58). Die große chemische Verschiebung der S 2p Bindungsenergiewerte gab den Anstoß zur Korrelation dieser Werte mit der nach Pauling berechneten Partialladung, und es konnte eine sehr gute lineare Abhängigkeit gefunden werden, die sich auch durch verfeinerte MO(SCF,CNDO)-Berechnungen nicht entscheidend verbessern ließ (59,60).

Die S 2p-Region ist aufgrund ihres günstigen Meßbereichs (niedrige BE = hohe kinetische Energie) und der hohen maximalen Verschiebung von 9,5 eV, trotz der leicht erhöhten Halbwertsbreite aufgrund ihrer Doublettstruktur besonders zu XPS-Untersuchungen an biologischem Material geeignet. Da proteingebundener Schwefel oftmals Ligandenfunktion ausübt, ist bei XPS-Untersuchungen an Metallproteinen immer auch die S 2p-Region vermessen worden (9,14,61).

Es wurden Ferredoxine, Metallothioneine, Cupreine, Papain untersucht (62). Es konnten chemische Verschiebungen der S 2p-Linie und das Auftreten multipler Signale gefunden werden, die das Vorhandensein von S-Spezies unterschiedlicher Ladungsdichte anzeigten. Signalverbreiterung, Satellitenbildung und Signalintensität können zusätzliche Informationen liefern. Da die Bindungsenergie auch von weiteren Parametern wie Madelungpotential, Relaxationsenergie und Aufladungserscheinungen abhängt, ist es immer von Vorteil,

homologe Verbindungen oder unterschiedliche Redoxzustände ein und desselben Moleküls zu untersuchen.
Die Se 3p1/2 und 3p3/2 und die Se 3d3/2 5/2 Linien zeigen hinsichtlich chemischer Verschiebung und Intensität große Ähnlichkeit zum Schwefel im röntgenphotoelektronenspektroskopischen Verhalten, und Selen ist aufgrund seines geringen Gehalts (1:1 Stöchiometrie) und seines spezifischen Einbaus oft eindeutiger bestimmten Strukturelementen zuzuordnen (63,64).

1.5. Engere Problematik

Mit Hilfe der Röntgenphotoelektronenspektroskopie sollten Redoxprozesse von S und Se "in situ" nachgewiesen werden. Es sollten chemische Veränderungen, wie z.B. Oxidationsreaktionen, Artefaktbildung, Photoreaktionen, vor und während des Meßvorgangs weitgehend ausgeschlossen werden und nur unter kontrollierten Bedingungen gemessen werden. Hierzu war es erforderlich, die Nativität und Homogenität der Proteine durch zusätzliche UV-, DC-, AA-Messungen und chromatographische Methoden zu überprüfen.
Es wurden eine Reihe exemplarischer Proteine untersucht, von denen entweder eine große Zahl verläßlicher physikalisch-chemischer Messungen bekannt war oder deren katalytische Eigenschaften ein besonderes Verhalten des Schwefels erwarten ließ. Neben anorganischen Verbindungen, Aminosäuren und Peptidverbindungen sowie niedermolekularen

Modellverbindungen wurden folgende Proteine mit XPS untersucht: Cytochrom C, Myoglobin, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, Papain, Serumalbumin, Thioneine, Glutathionperoxidase und Rhodanese.
Bei den XPS-Messungen an Cytochrom C sollte insbesondere darüber Aufschluß erlangt werden, inwieweit die Schwefelatome an Redoxprozessen beteiligt sind und welche Veränderungen sich in Cyano- und anderen Derivaten ergeben.
Myoglobin, das nur zwei Methionin pro Molekül enthält, eignet sich zur Untersuchung von proteingebundenen Thioäthergruppierungen.
Rhodanese, Thiosulfat-Sulfotransferase, sollte aus Rinderleber isoliert werden, auf etwaigen Metallgehalt hin untersucht werden, und das Enzym in seiner S-beladenen und -freien Form untersucht werden. Da die Frage der biologischen Funktion und damit seiner eigentlichen Spezifität nicht geklärt ist, sollten auch einige der niedermolekularen Sulfanschwefelakzeptoren und -Donoren auf ihren Ladungszustand hin vermessen werden.
In Papain und Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase sollte die Oxidation der Thiolreste zu Sulfensäure mit Hilfe von H_2O_2 röntgenphotoelektronenspektroskopisch verfolgt werden.

Von Glutathionperoxidase und insbesondere Serumalbumin wurde ebenfalls die S 2p-Region vermessen, um Referenzspektren für die weiteren Untersuchungen zu erhalten.
In Zn, Cd-Metallothionein aus Rattenleber sollte die Reaktion des Zn-thioneins bzw. des Apothioneins mit Selenit untersucht und die Selenotrisulfidbildung mit niedermole-

kularen Thiolen wie N-Acetylcystein, Dodecanthiol, d-Penicillamin als Modellreaktion herangezogen werden. Insbesondere die Reaktion von d-Penicillamin mit Selenit, die möglicherweise pharmakologisches Interesse besitzt, sollte eingehend auf das Reaktionsprodukt hin bei verschiedenen pH-Werten mit Hilfe von UV, CD und XPS untersucht werden.

Der "in vitro" Seleneinbau in die Rhodanese sollte durchgeführt werden, um mit Hilfe von XPS und CD, soweit methodisch möglich, weitere Beweise für das Vorliegen einer Persulfid- bzw. Perselenidgruppierung zu erhalten.
Niedermolekulare Thiole wie z.B. Cys, d.PA, bilden im stark alkalischen Milieu Persulfide bzw. Perselenide aus, deren Chromophor mit Hilfe von CD charakterisiert werden sollte.

Hochmolekulare Thiosepharose sollte als Modellsubstanz für die Synthese von Persulfiden und Perseleniden im Festzustand dienen.
Die Ladungszustände des Se in der Glutathionperoxidase sollten auf weitere intermediäre Stufen im oxidierten und reduzierten Zustand des Proteins hin untersucht werden.

Im Vordergrund der Problematik stand in allen Fällen die präparativen Aspekte meist leicht oxidabler Moleküle, sowie die Korrelation der Messungen mit homologen und chemisch verwandten Modellverbindungen.

2. MATERIAL

2.1. Chemikalien

Celite 535 pract.	Serva, Heidelberg
Chelex 100, P-2, P-30	Bio-Rad, Richmond
Cystein	Serva, Heidelberg
Ethylendiamin	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Glutathion	Fluka, Buchs
Kaliumsulfit K_2SO_3	Riedel de Haen AG, Seelse-Hannover
Kaliumpolysulfid $K_2S_x^{2-}$	Merck, Darmstadt
Kaliumthiocyanat	Merck, Darmstadt
Kupferbromid	Baker Analysed, Phillipsburg
Kupfer(II)-sulfit-5-hydrat p.A.	Merck, Darmstadt
Penicillamin	Fluka AG, Buchs
Selen, grau	Riedel de Haen AG, Seelse-Hannover
Selen, schwarz	Merck, Darmstadt
Selendioxid	Merck, Darmstadt
Sepharose G-25, G-75, G-50	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala
Thiopropyl-Sepharose 6B	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

2.2. Enzyme

Cytochrom C (Pferdeherz)	Sigma, München
Myoglobin (Pferdemuskel)	Sigma, München
Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase (Hefe)	Boehringer, Mannheim
Papain	Boehringer, Mannheim
Serumalbumin	Serva, Heidelberg

Alle weiteren Reagenzien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Alle Chemikalien waren von p.a. Qualität.

Lapuslazuli und Ultramarin wurden von Herrn Professor Weiskirchner, Mineralogisches Institut Tübingen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das verwendete Wasser war deionisiert und quarzdestilliert.

2.3. Geräte

Geräte für präparatives Arbeiten

Beckman J-21B Kühlzentrifuge

Heraeus-Christ Tischzentrifuge

MSE Highspeed 18 Kühlzentrifuge

MSE Mistral 6L Kühlzentrifuge

Sorvall Automatic Superspeed Tischzentrifuge

Fraktionensammler mit Uvicord II und Schreiber von LKB, Stockholm

Fraktionensammler mit Monitor UA-5 von ISCO, Lincoln

Amicon Ultrafiltration-Geräte mit UM-2 Filter

Gefriertrocknung von Colora, Lorch

pH-Meter von Radiometer,Kopenhagen

Analytische Verfahren:

Zeiss Flammenphotometer M4QIII kombiniert mit PMQ II

Perkin Elmer Atomic Absorption Spectrophotometer 400S

Gelelektrophorese Apparatur (GE-4) von Pharmacia, Uppsala

Beckman Spektrophotometer DB-GT

Unicam Spektralphotometer SP 1800

Zeiss Spektralphotometer PMQ II

JASCO J 20 Automatic Recording Spektrometer (Tokio, Japan)

Varian V-IEE 15 Photoelektronen-Spektrometer mit einem on-line 620 L, 8 K Computer

3. METHODEN

3.1. Präparate

3.1.1. Anorganische Schwefelverbindungen

Folgende Thioverbindungen wurden nach Literaturangaben synthetisiert:

K_2FeS_2 (65), $NH_4MoO_2S_2$ (66), $BaCS_3$ (67), $Cu(NH_4)MoS_4$ (68), $Na_2S_3O_6$ (69), $Cu(en)_2(SCN)_2$ (70,71).

3.1.2. Anorganische Selenverbindungen

Folgende Präparate wurden entsprechend den Angaben aus der Literatur synthetisiert:

K_2SeSO_3 (72), NaHSe (73), Na_2SeO_4 (74), $K_2SeS_4O_6$ (75), KSeCN (76), NaSeCN (76).

PbSe, SnSe, As_2Se_3, P_4Se_3 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. R. Blachnik und Eimo Enninga, Gesamthochschule Siegen, zur Verfügung gestellt. Sie wurden im Schmelzverfahren durch Reaktion stöchiometrischer Mengen der Elemente hergestellt.

3.1.3. Selenotrisulfide

Die Selenotrisulfide von Mercaptoäthanol, Dodekanthiol, N-Acetylcystein und d-Penicillamin wurden ebenso wie das metallfreie Thionein durch Umsatz der Thiolreste mit Selenit im Verhältnis von 4:1 nach (77) dargestellt.
Die Reaktion wurde in 10 mMol/l Kaliumacetatpuffer pH 3,5 bei 4°C unter Stickstoff durchgeführt, um unkontrollierte Oxidationsprozesse zu vermeiden.
Im Falle des Selenodipenicillamin wurde die Reaktion zusätzlich in neutralem pufferfreiem Wasser durchgeführt und ein kristallines Produkt unter allen Synthesebedingungen erhalten. Dieses konnte in Wasser/Äthanol-Gemischen mehrfach umkristallisiert werden.
Zinkthionein wurde aus der Leber Zn-vorbehandelter Ratten isoliert (78) und durch Dialyse gegen 1n Essigsäure und 1 mM EDTA in das Apoprotein überführt. Der Metallgehalt wurde atomabsorptionsspektroskopisch verfolgt. Disulfide wurden mit Mercaptoäthanol in 8 Mol/l Harnstoff bei pH 8,5 zu Thiolen reduziert. Selenit (3,12 µMole) wurde einer Lösung von 5 mg Thionein in 10 mMol/l Kaliumacetatpuffer pH 3,5 zugesetzt. Nach 3-4 Stunden, unter Stickstoffspülung im Eisbad, wurde die Reaktion beendet. Die Reaktionsprodukte wurden auf einer Sephadex G 25-Säule (1,5 x 30 cm) aufgetrennt und entsalzt.

Perselenide

Cysteinperselenid wurde durch Zugabe von 0,5 Mol/l Cystein-

lösung zu 2,5 µMol Selenosulfat gelöst in 3 ml 2n KOH erhalten.
d-Penicillaminperselenid wurde durch Reaktion von 1 Teil 0,1 Mol/l d-Penicillamin gelöst in 0,5 Mol/l KOH mit 1 Teil 1 mMol/l K_2SeSO_3 und 0,75 mMol/l K_2SO_3 in Ammoniumcarbonatpuffer 100 mMol/l pH 9 erhalten.

Perselenid- und Persulfidmodellverbindungen

Nachdem Thiosepharose von den Orthonitrosulfenylpyridinyl-Schutzgruppen befreit worden war, wurde diese zur Darstellung von Persulfiden und Perseleniden in fester Form herangezogen (79). 2 ml gequollenes Thiosepharosegel entsprechend 330 mg Trockengel wurde mit 10 ml 2n KOH, 1 mMol K_2SeSO_3 enthaltend, versetzt. Die Farbe des Gels schlug nach orange um. Das Gel wurde auf dem Büchnertrichter abgesaugt, mehrmals in 2n KOH gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das Persulfid wurde analog mit $K_2S_2O_3$ anstelle von K_2SeSO_3 dargestellt. Es wurde ein Farbumschlag nach gelb beobachtet. Der maximale Gehalt der Thiosepharose unter den obigen Reaktionsbedingungen beträgt an Selen 0,47 %, an Schwefel 0,39 %, wovon 0,19 % als Persulfidschwefel vorliegen können.

3.1.4. Isolierung von Rhodanese aus Rinderleber

3.1.4.1. Rohhomogenatfraktion

1 kg bei -20°C gefrorene Rinderleber wurde nach langsamem Auftauen bei 2°C in 1 l 50 mM Kaliumacetatpuffer pH 5 1 mM Kaliumthiosulfat im Starmixer homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 3000 UpM wurde der Niederschlag nochmals mit der gleichen Menge Puffer extrahiert und erneut zentrifugiert. 100 ml der vereinigten Überstände enthielten 56 g Protein (80,81).

3.1.4.2. Ammoniumsulfat-Cellit-Chromatographie (89,90,91)

100 ml Rohhomogenat wurden mit Cellit im Verhältnis Protein/Cellit = 1:10 versetzt. Zu dieser Cellitsuspension wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 60 % hinzugefügt, 1/2 Stunde gerührt und in eine Säule (5 x 30 cm) gefüllt. Nach Spülen mit dem dreifachen Säulenvolumen 50 mM Kaliumacetatpuffer pH 5,3, 1 mM $K_2S_2O_3$ und 60 % Ammonsulfat trat Gelbfärbung ein. Ein Ammonsulfat-Gradient von 60-30 % Ammonsulfat Kaliumazetatpuffer pH 5 und 1 mM $K_2S_2O_3$ mit einem Gesamtvolumen von 2 l wurde durchgepumpt. Nach 16 Stunden wurden alle Fraktionen auf Protein und Rhodaneseaktivität untersucht. Die Rhodanese-aktiven Fraktionen (ca. 350 ml im ansteigenden Teil der A_{280}-Elutionskurve) wurden gesammelt. Nach einer Fällung bei 2,4 M Ammon-

sulfat wurde bei 7000 UpM zentrifugiert und der Niederschlag in 35 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,6 1 mM $K_2S_2O_3$ gelöst.

3.1.4.3. Gelfiltration

Diese Lösung wurde auf eine mit gleichem Puffer equilibrierte Sephadex G 75 Säule (150 x 4 cm) aufgetragen. Das Eluat wurde in 10 ml Fraktionen gesammelt. Die Rhodaneseaktivität befand sich im absteigenden Teil der 3. A_{280}-Bande. Die aktiven Enzymfraktionen wurden gesammelt und in Gegenwart von 0,5 % Laktose lyophilisiert. Die Menge an Protein-Lyophilisat betrug 860 mg.

3.1.4.4. Umkristallisation

Die folgenden Schritte wurden bei $2^{\circ}C$ nach (82) durchgeführt. Den rhodanesehaltigen Fraktionen aus dem Sephadex G 75 Lauf wurde ein gleich großes Volumen 3,6 Mol/l Ammonsulfatlösung zugegeben und der pH auf 4,3 mit kalter 1 M Essigsäure eingestellt. Nach 1 Stunde vorsichtigem Rühren wurde die ausgefallene Rhodanese zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in etwa 10 ml 1,8 molarer Ammonsulfatlösung, die auf pH 7,9 mit konzentriertem Ammoniak eingestellt war, aufgenommen, 120 Min. gerührt und die unlöslichen gelben

Proteine abzentrifugiert. 3,6 molare Ammonsulfatlösung pH 7,9 wurde bis zur leichten Trübung tropfenweise zugegeben, bis zu einer Ammonsulfatkonzentration von etwa 2 Mol/l. Durch Auflösen des Niederschlags in 10 mMol Kaliumphosphatpuffer pH 7,6 und erneutes Fällen der Rhodanese in 2molarer Ammonsulfatlösung pH 7,9 wurde die spezifische Aktivität der Rhodanese weiter erhöht.

3.1.4.5. Selen-substituierte Rhodanese

Sulfatfreie Rhodanese wurde durch Dialyse von etwa 5 mg Enzym in 1 ml 100 mMol/l Ammoniumkarbonatpuffer pH 9 gegen eine Kaliumsulfitlösung dargestellt, die in zehnfachem Überschuß bezogen auf Rhodanese vorlag. Durch Dialyse gegen Puffer allein wurde das Sulfit entfernt. Die schwefelfreie Rhodanese wurde mit einem 10-fachem Überschuß an Kaliumselenosulfatlösung umgesetzt. Zur Stabilisierung der Selenosulfatlösung wurde die Reaktion bei pH 9 und in 100 mMol/l Ammonsulfatpuffer sowie mit einem Kaliumsulfitanteil von 40 % bezogen auf Kaliumselenosulfat bei 4^{o}C durchgeführt. Nach 1 Stunde wurde die Rhodanese auf einer Sephadex G 50- oder Biogel P 2-Säule entsalzt.
Mit Hilfe von Selenanalyse, Proteinbestimmung, UV-Absorption und Aktivitätsbestimmung wurde die Rhodanese identifiziert. Durch die desaktivierende Wirkung des zugefügten Kaliumsulfits war jedoch die enzymatische Aktivität gering. Die Selen-substituierte Rhodanese enthaltende Fraktion wur-

de durch Membranfiltration eingeengt oder sofort lyophilisiert (83).

3.2. Analytik

3.2.1. Rhodanese-Aktivität

Die Rhodanese-Aktivität wurde in einem modifizierten Sorbötest bestimmt (82,84). Der Testansatz enthielt in dieser Reihenfolge 200 µl Natriumthiosulfat (auf 50 µMol), 200 µl Kaliumcyanid (50 µMol) in 50 mMol/l Kaliumphosphatpuffer pH 8,6, 500 µl Kaliumphosphatpuffer 50 mMol/l pH 8,6, 0,4 Mol/l Glycin, 100 µl Probe; nach einer Inkubationszeit von 1 Min. bei 22°C wurden 500 µl 17 %iges Formaldehydreagenz und 1500 µl Sorböreagenz hinzugefügt (10 g $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, 100 ml HNO_3 conc., 100 ml bidest. H_2O) und die Extinktion des roten Eisenrhodanidkomplexes bei 460 nm gemessen. 1 µMol SCN^-/Min. entsprechen 0,108 Extinktionseinheiten. Diese Zuordnung wurde mit einer KSCN-Eichkurve überprüft. Die Enzymeinheit ist definiert als die Menge Rhodanese, die 1 mMol SCN/min (pH 8,65, 20°C) erzeugt.

3.2.2. Proteine

3.2.2.1. Proteinbestimmungen

In den Eluaten wurde Protein anhand seiner A_{280}-Absorption im Uvicordspektrometer verfolgt.
Protein wurde mit der Mikrobiuretmethode nach Goa (85) bestimmt. Nach 15 Min. wird die Extinktion bei 330 nm gegen einen Reagentienleerwert gemessen. Reine Proteine wurden anhand der jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt.

3.2.2.2. Metalle

Atomabsorptionsspektroskopie

Der Metallgehalt von Proteinfraktionen wurde atomabsorptionsspektroskopisch ohne weitere Vorbehandlung der Proben gemessen (86). Als Brenngasmischung wurde Acetylen/Luft verwendet. Eichkurven wurden mit $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$, $3\ CdSO_4 \times 8\ H_2O$ und $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ hergestellt. Monochromatoreinstellung: Zn 213,8 nm, Cd 228,8 nm, Cu 324,7 nm. Als Geräte wurden ein Zeiss M4QIII, kombiniert mit einem PMQII und einem Linecomp Schreiber, sowie ein Perkin-Elmer Atomic Absorption Spectrophotometer 400S verwendet.

3.2.2.3. SDS-Gelelektrophorese

Zur Homogenitätsüberprüfung wurden Proteine einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen (87).
Als Elektrodenpuffer diente 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2, wobei die obere Elektrodenkammer zusätzlich 0,1 % Natriumdodecylsulfat enthielt.
Die Proben (2 mg/ml) wurden in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2, gelöst und vor dem Auftragen 60 Min. bei 45°C in 1 %igem SDS, 4 M Harnstoff und 1 %igem Mercaptoäthanol inkubiert. Die Elektrophoresedauer betrug 2,5 Stunden bei 100 V und 200 mA. Die Anfärbung erfolgte mit einer Coomassie-Brillant-Blue Lösung (0,03 %ige Lösung in Eisessig, Methanol, Wasser, Trichloressigsäure 7/20/80/6, v/v/v/w). Färbedauer 12 Stunden. Das Entfärbebad hatte folgende Zusammensetzung: Eisessig, Methanol, Wasser 1/6/14, v/v/v).

3.2.3. Elementaranalyse

C, H, N, S-Analysen wurden in einem Perkin-Elmer Model 240 Elemental Analyzer durchgeführt.
Selenbestimmungen wurden modifiziert nach Watkinson durchgeführt (88,92).

3.2.4. Elektronenabsorptionsspektroskopie

UV-Spektren wurden mit einem Unicam SP 1800 sowie mit einem Beckman Spektrophotometer DB-GT aufgenommen.

3.2.5. Circulardichroismus

Circulardichroismus-Spektren wurden mit einem Jasco JA20 A Spektropolarimeter in Zylinderküvetten mit einem Durchmesser von 0,01 bis 1 cm aufgenommen. Die Eichung des Geräts erfolgte mit Epiandrosteron; die Meßbedingungen wurden für die jeweilige Probe optimiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte nach der Formel für die molare Elliptizität

$$\theta = a \frac{MG \cdot 100 \cdot E}{c.e} \qquad \frac{Grad \cdot cm^2}{decimol}$$

MG = Molekulargewicht

a = Amplitude (cm)

E = Empfindlichkeit in Millidegree

c = Konzentration in mg/ml

l = Schichtdicke der Küvette in cm

Im Meßbereich von 180-230 nm wurden Küvetten von 0,1 mm verwendet bei Proteinkonzentrationen von 6 mg Protein/ml; über 230 nm 10 mm-Küvetten bei ca. 2 mg Protein/ml.
Die molaren Elliptizitäten wurden im Fall der Persulfide und Perselenide auf das eingesetzte Selenosulfat und Thiosulfat bezogen, bei der Rhodanese auf ein Molekulargewicht von 33 000.

Das Prinzip der CD-Spektroskopie beruht auf der unterschiedlichen Absorption der rechts und links drehenden Komponente des polarisierten Lichts bei optisch aktiven Substanzen. Die beiden Vektoren ε_L und ε_R werden somit bei Durchlaufen der Substanz verschieden lang.
Als Meßgröße dient die Elliptizität θ, die in der Form $\theta = A \cdot c \ (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \ d$ die molaren Extinktionskoeffizienten ε_L und ε_R enthält (93,94,95,96).

3.2.6. Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Röntgenphotoelektronenspektren wurden mit Hilfe eines Varian V-IEE 15 Photoelektronenspektrometers, das mit einem on-line 620 L Computer versehen ist, aufgenommen. Als Röntgenquelle dient eine Mg-Anode, die $MgK_{\alpha 1,2}$ Röntgenstrahlung liefert. Diese ist nicht völlig monochromatisch, da neben dem Hauptsignal immer ein Nebensignal mit etwa 5 % Intensität bei 8,5 eV niedrigerer Bindungsenergie entsteht, das auf die Mg $K_{\alpha 3,4}$-Strahlung zurückzuführen ist. Diese beruht auf einem Elektronenübergang des in der K-Schale doppelt ionisierten Mg-Atoms: Mg $1s\ 2s^2\ 2p^5$ —— Mg $1s^2\ 2s^2\ 2p^4$.

Die Röntgenenergie betrug in der Regel 10 kV, 100 mA. Im Hochvakuum bei ca. 1 µTorr werden durch die Röntgenstrahlung an der Probenoberfläche Elektronen emittiert, deren kinetische Energie mit Hilfe der Photoelektronenspektroskopie sehr präzis bestimmt werden kann. Die Bindungsenergie

E_b errechnet sich aus der folgenden Gleichung:

$$E_b = E_h - E_{kin} - C.$$

Die Konstante C, die mehrere Parameter wie z.B. Gerätekonstanten (Potentialdifferenz zwischen Probe und Eintrittsspalt und den Energieunterschied zwischen Ferminiveau und Energieniveau des freien Elektrons) und Aufladungserscheinungen bei Nichtleitern enthält, läßt sich nicht für die jeweilige Probe rechnerisch bestimmen. Es werden daher Relativmessungen der Bindungsenergie vorgenommen, die auf das C_{1s} des Kohlenstoffs bei 284,0 eV bezogen werden. Andere Kalibrierungslinien wie z.B. Au 4f, wie in der Literatur vorgeschlagen, bieten keinen entscheidenden Vorteil. Mehrfachkalibrierungen wurden bei geeigneten Verbindungen wie z.B. die N 1s-Linie des Peptidstickstoffs vorgenommen, da diese die Zuordnung der Bindungsenergiewerte weiter absichern.

Meßregionen der Elemente

Vom Schwefel wurde die nicht aufgelöste S $2p_{1/2,3/2}$ - Doublett-Linie in der Region von 160-170 eV untersucht. Die S 2s-Linie, die zwar keine Spin-Orbit-Aufspaltung zeigt, wurde nicht berücksichtigt, da sie weniger intensiv und breiter als die S 2p-Linie ist.
Falls Selen in der Probe enthalten ist, kommt es in der S 2p-Region zu einer Linieninterferenz mit den Se $3p_{1/2,3/2}$-Doublett-Linien, sodaß diese Spektren nur bei einem großen Überschuß eines der beiden Elemente ausgewer-

tet werden können. Selen wurde deshalb in der Region der Se $3d_{3/2,5/2}$-Linie von 53-60 eV gemessen. Diese Linie ist sehr intensiv, zeigt analoge chemische Verschiebungen und befindet sich in einer Meßregion hoher kinetischer Energie, die bei geringen Selenkonzentrationen in der Probe optimale Empfindlichkeit gewährleistet. Eisen und Lithium können in dieser Region stören.

Nachweisgrenze für Se, S, Cu

Die allgemein akzeptierte Definition der Empfindlichkeit gibt die Steigung einer Eichkurve an, die das Verhältnis der Veränderung einer Signalhöhe zur Konzentration eines Stoffes angibt.
Als Oberflächenmethode können für die Photoelektronenspektroskopie folgende allgemeine Werte für Oberfläche und Gesamtprobe angegeben werden (97):
Die Grenze der Empfindlichkeit liegt bei etwa 1 % des Probenmaterials, bei etwa 10^{-8} bis 10^{-9} g Substanzmenge und 10 bis herab zu 0,01 monomolekularen Schichten auf der Oberfläche.
Die Probenoberfläche, die beim Varian-Probenträger 3 cm^2 beträgt, kann bis auf einige mm^2 reduziert werden. Diese allgemeinen Werte variieren je nach Element, Austrittstiefe der Elektronen, Linienlage und chemischer Umgebung.

Die Austrittstiefe ist durch die mittlere freie Weglänge der emittierten Elektronen limitiert. Nur die Elektronen, die nicht durch inelastische Streuung Energie auf dem Weg

zur Oberfläche verlieren, tragen zum Signal bei. Alle übrigen Elektronen bilden den kontinuierlichen Rauschhintergrund bei niedrigerer kinetischer Energie. Bei metallischen Proben wurde die Austrittstiefe zu 15 monomolekularen Schichten bestimmt und ein Minimum der Austrittstiefe bei einer kinetischen Energie der Elektronen von 100 eV festgestellt.

Für den Fall der Cu $2p_{3/2}$-Linien wirken sich die oben genannten Faktoren ungünstig auf die Linienintensität aus. Die kinetische Energie der Elektronen beträgt 322 eV und deutet auf eine geringe Austrittstiefe im Bereich von 10 A hin; zudem befindet man sich im Bereich einer hohen Hintergrundelektronenemission. Die Intensität der Cu $2p_{3/2}$-Linien des Erythrocupreins mit einem Cu-Gehalt von 0,4 % ist deshalb bereits sehr niedrig und Proteine mit geringerem prozentualen Cu-Gehalt befinden sich außerhalb der Nachweisgrenze.

Cu-Thioneine mit einem Cu-Gehalt von ca. 8 % liefern hingegen Spektren vorzüglicher Qualität, die auch Satellitenbildungen bzw. deren Abwesenheit sicher feststellen lassen.

Im Falle der Se 3d-Linien liegen insofern günstige Verhältnisse vor, als die hohe kinetische Energie von 1200 eV hohe Austrittstiefen, die im Bereich von 100 A liegen sollten, ermöglicht. Mit Hilfe eines Selenit-Albumin-Gemisches wurde eine Eichkurve erstellt, um Absolutwerte der Empfindlichkeit der Se 3d-Linie zu erhalten. Eine Albuminlösung von 0,3 mg/ml wurde mit einer Selenitlösung abnehmender Konzentration versetzt und 100 µl dieses Gemisches gleich-

mäßig auf dem Probenträger verteilt und lyophilisiert. Die Erfassungsgrenze für Selen betrug 4 x 10^{-6} Mol/l Selenit bei einem Selen/Albumin-Verhältnis von 1:10; die Absolutmenge des noch nachgewiesenen Selens betrug 0,4 nMol, bzw. 32 ng Selen.

Die S 2p-Doublett-Linie befindet sich mit einer Bindungsenergie von 163 eV ebenfalls in einem Bereich großer Nachweisempfindlichkeit.

Das Intensitätsverhältnis der S $2p_{3/2}$ und Se $3p_{3/2}$ ergibt sich mit Hilfe des photoelektrischen Querschnitts zu 2:1 (98).

Probenaufbereitung

Da die zu messenden Substanzen keinen höheren Dampfdruck als 10^{-5} Torr aufweisen dürfen, eignen sich zur Messung nur Festsubstanzen (10-50 mg) wie z.B. Kristalle, Lyophilisate und Pulver (letztere werden mit Hilfe eines Achatmörsers hergestellt).

Bei ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff können auch eingefrorene Lösungen untersucht werden (99,100).

Lösungen wurden in kleinen Volumina von 100 µl auf ein Plastik-Klebeband 600 P (Scotch 3M Comp.) gleichmäßig perlenartig aufgetragen und in der Vorkammer bei 10^{-3} Torr evaporiert. Flüssige Proteinlösungen wurden z.T. in der Vorkammer des Röntgenphotoelektronenspektrometers lyophilisiert und von hier direkt ins Hochvakuum überführt.

Bei Peptid- und Protein-Messungen ist die Probenvorbereitung wesentlich für das Erzielen günstiger Ergebnisse. Pro-

teine wurden in der Regel entsalzt oder auf flüchtige Puffer wie z.B. Ammoniumcarbonat umgepuffert, um störende Anionen, wie z.B. Sulfat, Phosphat und Silikat, zu entfernen, die das zu messende Element im Protein völlig verdecken können.

Um die Nativität der Proteine zu erhalten, wurde ein Zusatz von Lactose (0,5 - 1 %) verwendet, der zur dreidimensionalen Strukturerhaltung der Proteine im Hochvakuum beitragen soll.

Als Probenträger wurden quergeriffelte zylindrische Aluminiumprobenträger von 10 mm Durchmesser und glatte Aluminiumträger, die vollständig mit Klebeband doppelt umwickelt waren, sodaß die Klebeseite nach außen gekehrt war, verwendet.

Reine Aluminiumträger wurden vor Verwendung (ausschließlich Selenverbindungen) 3n HCl 1,5 Min. lang angeätzt, anschließend mit bidestilliertem Wasser und Aceton gewaschen und bei 90^{o}C getrocknet (101).

Um thermische Artefakte empfindlicher Substanzen zu vermeiden, wurde der Probenträger mit flüssigem Stickstoff auf unter -100^{o}C gekühlt. Dies geschah jedoch erst nach Erreichen eines Vakuums von mindestens 10^{-5} Torr, da sonst mit Kondensatbildung von Wasser und Kohlenwasserstoffen auf der Probenoberfläche gerechnet werden muß. Röntgenartefakte können im allgemeinen durch Kühlung mit flüssigem Stickstoff wenig beeinflußt werden (102). Durch Verkürzung der Meßzeiten sollte diese Störmöglichkeit ausgeschaltet werden. Niedermolekulare Substanzen wurden pro Elementregion

nicht länger als 5 Min. gemessen, bei Proteinen erwiesen sich 10 Min. pro Meßregion als ausreichend und optimal. Zudem wurde die Röntgenenergie nicht über 10 kV 100 mA erhöht. Röntgeninstabilität wurde als Reduktion von organischen Selenoxid- und Stickstoffoxidverbindungen sowie als Photoreduktion von Cu-Verbindungen beschrieben (63,103,104, 105). Es konnte mit dem Varian V-IEE 15 Gerät die Reduktion von Kaliumpermanganat und Kaliumperoxochromat sowie die Oxidation von Schwefel in Proteinen, wie z.B. Cuprein und Thionein nach Meßzeiten von mehr als 10 Minuten beobachtet werden. Durch laufende Beobachtungen der Spektren am Oszilloskop müssen diese strahlungsbedingten Prozesse, soweit sie im Minutenbereich ablaufen, ausgeschlossen werden.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. Schwefel

4.1.1. Anorganische Schwefelverbindungen

Zunächst wurden röntgenphotoelektrospektroskopische Messungen durchgeführt. In Tab. 1 werden die S $2p_{1/2,3/2}$-Dublettbindungsenergiewerte einer Reihe von anorganischen Substanzen aufgeführt, die möglicherweise modellhaften Charakter für proteingebundenen Schwefel besitzen und die Charakterisierung der Proteinspektren erlauben. Zusätzlich wurden die intensivsten Linien der Zentralatome bzw. Kationen vermessen (Cu $2p_{1/2}$, $2p_{3/2}$, K 1s, N 1s, Mo $2p_{1/2}$, $2p_{3/2}$, Fe 2p).

Allen Verbindungen ist gemeinsam, daß sie Schwefel in den Oxidationsstufen O bis -2 enthalten. Die Bindungsenergiewerte variieren innerhalb von 160,4 eV bis 163,7 eV für diese Schwefelspezies. In Übereinstimmung mit früheren Messungen findet man für den Schwefel in der Oxidationsstufe O wie z.B. in der oxidierten Liponsäure im Kaliumtrithionat und im Thiocystin Werte im Bereich von 163,0 ± 0,5 eV. Schwefel der Oxidationsstufe -1 wie im Kaliumpolysulfid zeigt nur ein Signal bei 161,8 eV der S 2p Bindungselektronen und deutet aufgrund des Fehlens eines Signals oder einer Schulter bei 163,0 eV für den elementaren Schwefel auf eine Ladungsdelokalisierung entlang den Polysulfidketten hin. Das käufliche Kaliumpolysulfid zeigt zusätzlich ein schwaches Signal bei 167,4 eV, was auf Oxidationsprodukte

Tabelle 1: Elektronenbindungsenergien der S 2p (1/2,3/2)-Orbitale anorganischer Schwefelverbindungen und Modelle für makromolekular gebundenen Schwefel.

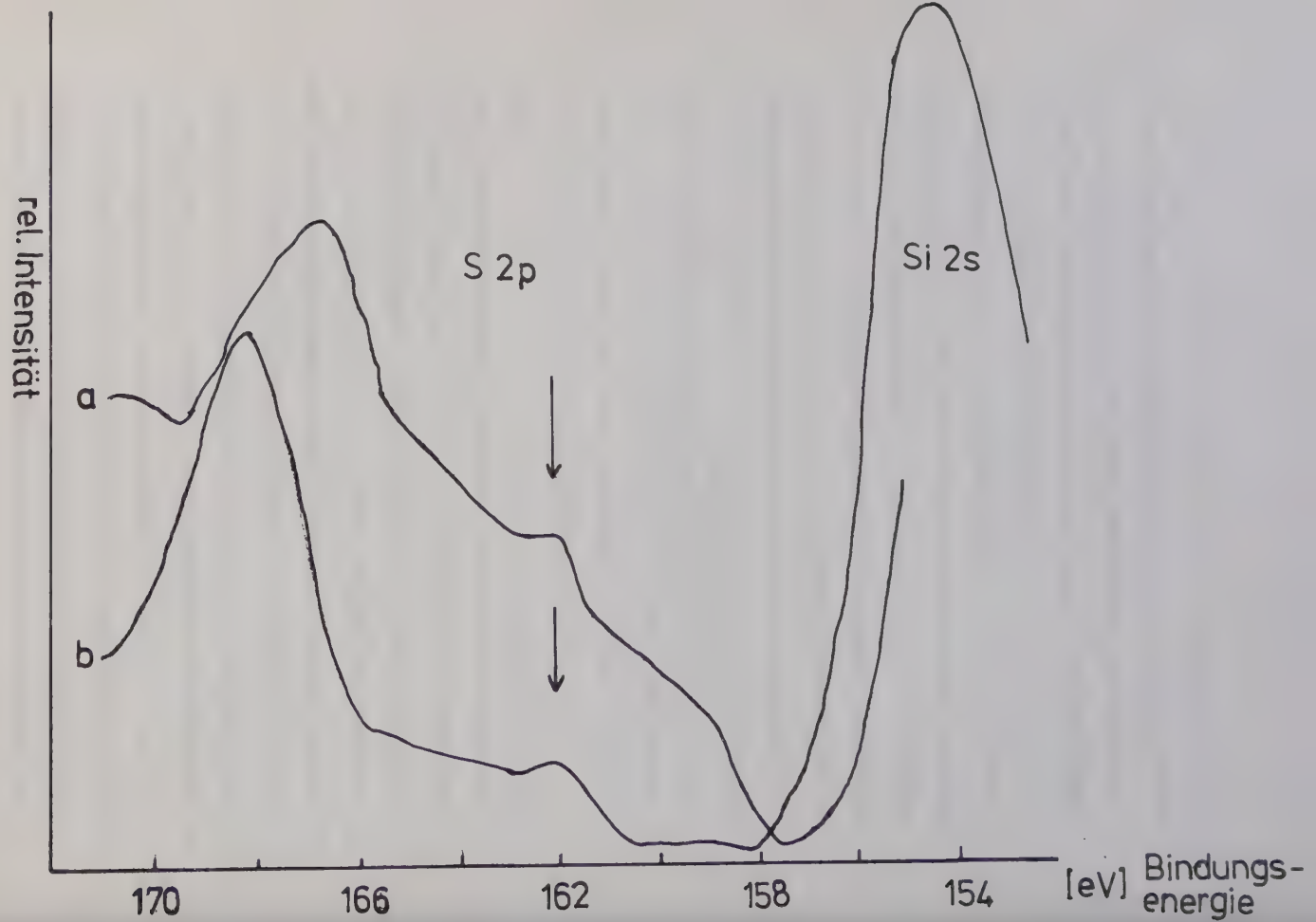
Verbindung	S 2p (1/2,3/2)		N 1s	O 1s	
$NH_4Cu\ Mo_2S_2$		160,4	400,5		394,6 (Mo 3p 3/2)
$NH_4Mo\ O_2S_2$		160,8	400,7	532,0	395,8 (Mo 3p 3/2)
$BaCS_3$		161,1			779,8 (Ba 2p)
$K_2(FeS_2)$		161,0			293,2 (K 2p 3/2)
$K_2S_2O_3$	166,6	161,0		532,0	d = 5,6 eV
$K_2(S_x)^{2-}$	167,4	161,8			d = 5,6 eV
Liponsäure		162,8		532,0	
Thiocystin		163,1	400,1	531,6	
KSCN		163,4	397,3		291,6 (K 2p 3/2)
$Na_2S_3O_6$	168,3	163,7		521,5	289,7 (K 2p 3/2)
$Cu(en)_2(SCN)_2$		162,0	400,0-398,5		944 Sat.932 Cu 2p 3/2 931,7 Schult. 933,5 Cu 2p 1/2 951,4 Photored.931,6
Ultramarin	166,8	162,0			156,9 Si 2s
Lapislazuli	168,0	162,0			
Thiosepharosepersulfid	166,3	161,7	398,2	531,0	d = 4,6 eV
Thiosepharoseperselenid	168,1	161,0			d = 7,1 eV Se 3d (3/2,5/2): 53,5

des Schwefels als Verunreinigung zurückzuführen ist.
Überraschend niedrige Bindungsenergiewerte besitzt der Thionylschwefel in den Molybdänverbindungen $(NH_4)_2MoO_2S_2$ und $NH_4Cu\ Mo_2S_2$ mit 160,4 eV bzw. 160,8 eV, während der Schwefel in der Thioverbindung Ba CS_3 nur Werte von 161,1 eV annimmt.
In NH_4CuMoS_2 kann die Zuordnung der Oxidationsstufe +II zu den Cu-Ionen aufgrund der Satelliten bei 944 und 965 eV bestätigt werden.

Von Ultramarin und Lapislazuli (31,33) wurden die S 2p-Bindungsenergieregionen vermessen, um die röntgenphotoelektronenspektroskopische Zuordnung der $\cdot S^{2-}$ und $\cdot S^{3-}$-Radikalionen zu erhalten. Die Röntgenphotoelektronenspektren zeigen jedoch mehrere Signale unterschiedlicher Intensität von Schwefelverbindungen, deren Oxidationsstufen von -2 bis +6 reichen. Ein Spektrum dieser Art wäre von einem Hydrolysegemisch des Ultramarin zu erwarten, das S_8, S^{2-}, $S_4O_6^{2-}$, SO_2, SO_4^{2-} enthalten kann (106). Oberflächenreaktionen, die mit der Röntgenphotoelektronenspektroskopie be-

---

Abb. 1: Röntgenphotoelektronenspektren der S 2p (1/2, 3/2)-Doublettlinie von Ultramarin (a) und Lapislazuli (b). Die in Achatmörser pulverisierten Proben wurden auf Klebeband (Scotch 3M Co) aufgetragen. Die Pfeile bezeichnen die mutmaßlich zugeordnete S 2p Bande des $\cdot S_2^-$-Ions. Am rechten Bildrand ist die Si 2s-Bande des Silikatanteils sichtbar.
Aufnahmebedingungen: $MgK_{\alpha 1,2}$ Röntgenanode mit 1100 Watt Leistung; Analysatorenergie: 100 W; work function 4,6 eV; sweep width 20 eV; Zahl der Scans: 25; die Glättungsfunktion wurde über (a) 15, (b) 25 Punkte gelegt; Temp.: $\sim 25^oC$; Druck: 1 µTorr.


rel. Intensität
S 2p
Si 2s
a
b
170
166
162
158
154
[eV] Bindungs-
energie

vorzugt nachgewiesen werden können, sind eine Ursache für die Form des erhaltenen Spektrums, obwohl frisch in einem Achatmörser pulverisiertes Ultramarin verwendet wurde. Das stärkste Signal des Lapislazuli liegt bei 168 eV und bei Ultramarin bei 166,8 eV; Werte, die man bei anorganischen Schwefelverbindungen der Oxidationsstufe +6 bzw. +4 finden würde. Sowohl beim Ultramarin wie beim Lapislazuli findet man einen weiteren Peak geringer Intensität bei 162,0 eV (Abb. 1). Es wäre attraktiv, diesen Bindungsenergiewert einem negativ geladenen Schwefelradikalion zuzuordnen und mit der Ladungsdichte eines solchen Ions vereinbar, jedoch ist diese Zuordnung spekulativ und kann nicht mit Gewißheit erfolgen.

Bei den Rhodanid enthaltenden Verbindungen KSCN und $Cu(en)_2(SCN)_2$ fallen die weit auseinanderliegenden Schwefelsignale von jeweils 161,9 eV und 163,4 eV auf. der Kupferkomplex, dessen Röntgenstrukturanalyse bekannt ist, enthält die Rhodanidliganden in den axialen Positionen des Oktaederkomplexes mit dem Schwefel an das Zentralatom gebunden in gewinkelter Anordnung (70). Der Bindungsenergiewert von 161,7 eV deutet auf eine stark ionisch gebundene, negativierte Form des Rhodanid hin. Im Gegensatz hierzu erscheint der Schwefel im KSCN mit einer Bindungsenergie von 163,4 eV - kaum negativ geladen - in einem Bereich, in dem Schwefel der Oxidationsstufe 0 gefunden wird.

$Cu(en)_2(SCN)_2$ zeigt die Besonderheit, daß der Ladungstransfer vom Schwefel zum CuII, wie bei zahlreichen CuS-Verbindungen, nicht beobachtet werden kann. Folglich zeigt das

Cu $2p_{3/2}$-Spektrum einer CuII-Verbindung mit den Satelliten bei ca. 11 eV höhere Bindungsenergie. Der erhöhte Bindungsabstand zwischen CuII-Zentralatom und dem Schwefel des gewinkelt angeordneten Rhodanidions, der durch die oktraedrische Zuordnung des Liganden bedingt wird und durch den Jahn-Teller-Effekt verstärkt wird, kann als Ursache der verminderten Cu-S-Wechselwirkung angesehen werden. Die Messungen an diesem Komplex widerlegen jedoch die Ansicht, daß die Abwesenheit der CuII-typischen Satelliten von vielen Cu-S-Verbindungen durch Photoreduktion verursacht ist (107). Beginnende Photoreduktion ist erst nach 20-minütiger Röntgenbestrahlung festzustellen und wird durch Kühlung mit flüssigem Stickstoff verzögert.

4.1.2. Modelle für gebundenen Schwefel in biologischen Systemen

In einer Reihe von Proteinen und Peptiden wie z.B. Thiosulfat-Sulfo-Transferase (23), Xanthinoxidase (108), Malatdehydrogenase (109) wurden Persulfide, in Glutathion Perselenide (110), als intermediäre metabolische Strukturelemente postuliert. Es erschien daher von großem Interesse, Modellsubstanzen zu synthetisieren, die aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts einen deutlichen Gehalt an den gewünschten Strukturen aufweisen und es sollten diese im Falle der festen Thiosepharosederivate mit Hilfe von Röntgenphotoelektronenspektroskopie und im Falle der löslichen Thiolpersulfide und -perselenide mit Hilfe von UV- und CD-

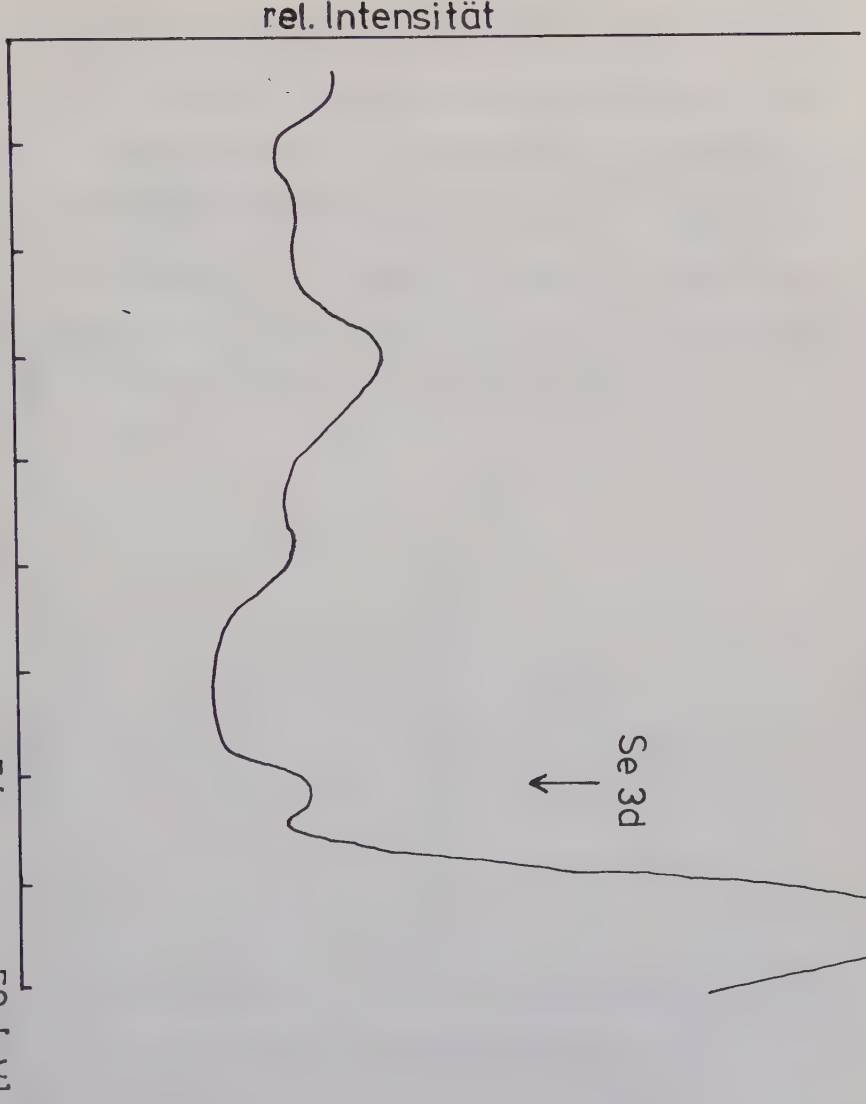
Spektroskopie untersucht werden.

Obwohl der Gehalt an Persulfidschwefel bzw. Persulfidselen in den Sepharosederivaten maximal im Bereich von 0,5 % liegt, konnten dennoch verwertbare Photoelektronenspektren erhalten werden (111).

Sowohl das Thiosepharosepersulfid wie das Thiosepharoseperselenid zeigen in der S 2p-Bindungsenergieregion Signale oxidierten Schwefels bei 168,1 bzw. 166,3 eV. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um Oxidationsprodukte, die im stark alkalischen Milieu (2n KOH) bei der Darstellung der Verbindungen aus freien Thiolresten entstanden sind. Das Signal bei 161,7 eV des Thiosepharosepersulfids setzt sich aus den Signalen des Thiolschwefels und des Persulfidschwefels zusammen. Im Falle des Thiosepharoseperselenids kann das Signal bei 161,0 eindeutig den modifizierten Thiolatresten zugeordnet werden.

Die Perselenidreste ergeben eine Se 3d Linie bei 53,5 eV; dies ist mit einer Oxidationsstufe des Perselenids von -I vereinbar (Abb. 2).

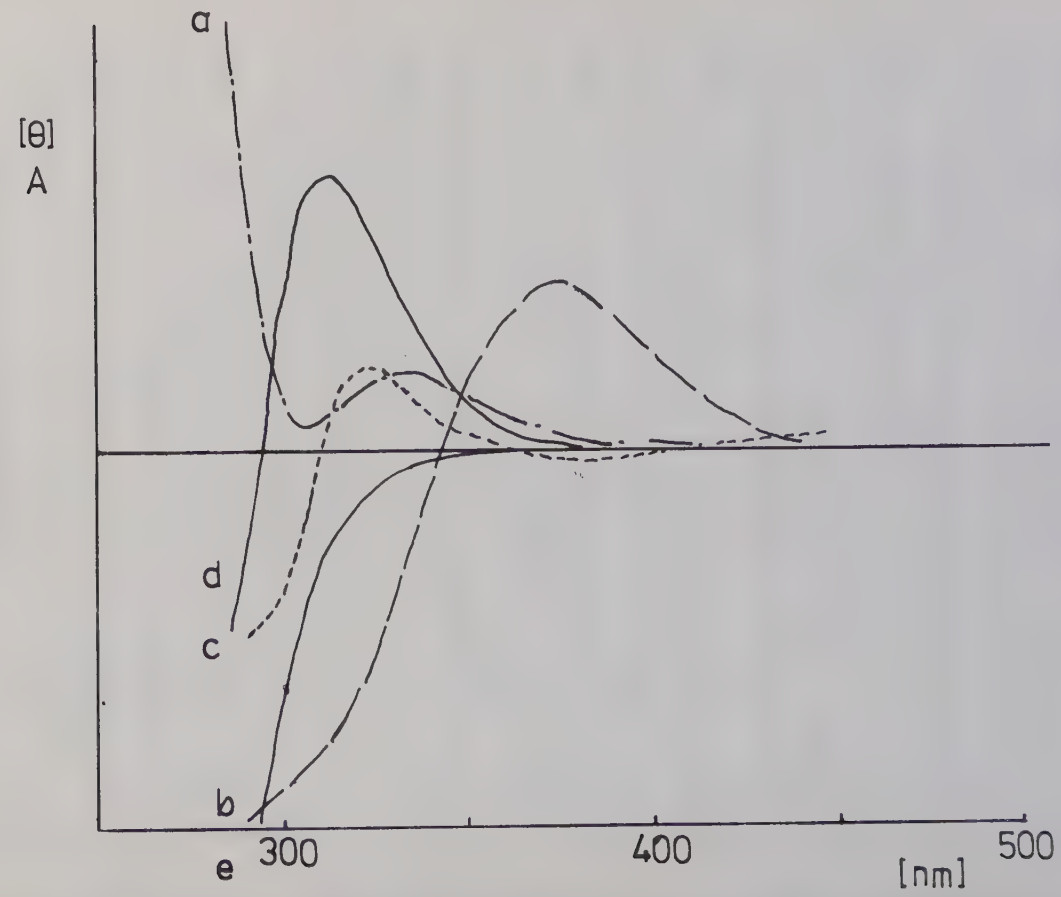
Abb. 2: Röntgenphotoelektronenspektrum der Se 3d (3/2,5/2) Linie des Perselenidderivats der Thiosepharose 6B (siehe Pfeil). Zusätzliche Banden bei 62 eV und 51 eV können der Na 2s und Mg 2p-Bande zugeordnet werden.
Aufnahmebedingungen: $MgK_{\alpha 1,2}$-Anode bei einer Röntgenleistung von 1100 Watt; Analysatorenergie 100 eV, work function 4,6 eV, sweep width 20 eV, Zahl der scans: 25; die Glättungsfunktion wurde über 25 Punkte gelegt.


rel. Intensität
Se 3d
66
62
58
54
50 [eV]
Bindungsenergie

Da Perchalkogenide niedermolekularer Thiole nur im stark alkalischen Bereich stabil sind, konnten diese nur in Lösung untersucht werden. Es war daher von Interesse, ob der Chromophor der Persulfide bei 340 nm und der Perselenide bei 370 nm entsprechende Cottoneffekte bei CD-Messungen zeigen würden. Es konnten im Fall des d-Penicillamin und des l-Cystein ausgeprägte Cottoneffekte mit umgekehrten Vorzeichen für die jeweiligen Persulfide bei 340 nm sowie für die Perselenide bei 370 nm gefunden werden (s. Abb. 3).

Abb. 3: CD-Spektren von Perseleniden und Persulfiden und Selenotrisulfiden

a) l-Cysteinpersulfid; Cys: c=0,25 M; $S_2O_3^{2-}$: c=50 mM
b) l-Cysteinperselenid; Cys: c=0,25 M; $SeSO_3^{2-}$: c=2,5 mM
c) d-Penicillaminperselenid; d-Penicillamin: c=0,25 M; K_2SeSO_3: c=10 mM, 0,5 M KOH
d) Selenodipenicillamin: c=1 mg/ml
e) Cystein in 2n KOH gelöst


a
[θ]
A
d
c
b
e
300
400
500
[nm]

4.1.3. Proteine

4.1.3.1. Cytochrom C (aus Pferdeherz)

Die Fe 3d-, Fe 2p-, N1s-, C 1s- sowie die S 2p-Bindungsenergieregionen von verschiedenen Cytochrom C-Proben wurden untersucht, um Informationen über den Ladungszustand von allen der 4 Schwefelatome im Cytochrom C-Molekül zu erhalten. Die 4 Schwefelspezies, die zum S 2p-Signal beitragen, sind 2 Thioäther, die die Hämgruppe kovalent binden, sowie 2 Thioäther in Form von Methionin-Resten (24), von denen eines als axialer Schwefelligand an das Hämeisen im oxidierten Zustand des Cytochrom C fungiert, wie aus Röntgenstrukturanalysen hervorgeht (26). Um Konformationseinflüsse, die Folge unterschiedlicher Redoxzustände sein können, auf die Bindungsenergie des Schwefels zu analysieren, wurden die Cytochrom C-Proben im oxidierten und reduzierten Zustand als Cyanoderivat, lyophilisiert, als mikrokristallines Pulver und auch flüssig (mit Evaporation während der Messung) untersucht (Tab. 2).
In allen Fällen konnten Satellitensignale mit höherer Bindungsenergie als 162,0 eV gefunden werden, die in unterschiedlicher Intensität (von 25 % bis 300 %) auftraten. Die Satellitenlinien traten bei 168,0, 167,5 und 166,0 eV auf. Das oxidierte Cytochrom C als mikrokristallines Pulver wie im Handel erhältlich zeigte ein Hauptsignal bei 163,0 eV mit einem Satelliten bei 168,1 eV von 28 %iger Intensität des Hauptsignals. Das deutet darauf hin, daß entweder 1/4 aller Schwefelatome positiviert bzw. oxidiert

Tabelle 2: Elektronenbindungsenergien der S 2p (1/2,3/2) Dublettlinien von Serumalbumin, Myoglobin und Cytochrom C und deren Derivate

Verbindung	S 2p (1/2,3/2)		N 1s	O 1s	Sonstige Linien
Cytochrom C (mikrokristallin)	168,1	162,6	399,9	531,7	28 %[a]
2. Messung	169,1	163,3	399,9	531,7	40 %
Cytochrom C (gelöst 10 mg/ml)	166,0	163,0	399,7	531,4	63 %
Cytochrom C (dto.+ CN^-) 167,7	164,3	162,4	399,4	531,7	276 %; 101 %
Cytochrom C (dto.+ Ascorbat)	167,4	162,8	399,6	531,8	94 %
Cytochrom C (red. u. lyoph.)	166,6	163,1			28 %
Cytochrom C (dto.+ 10 µl H_2O_2)	167,5	-			222 %
Serumalbumin	168,0	163,2			61,9 Na 2s 51,3 Mg 2p
Myoglobin	166,3	162,6	399,0	530,8	51,4 " 75 %
" (2. Messung)	166,1	162,8			119 %
Myoglobin (Lösung 10 mg/ml)	166,0	162,6	399,1	531,1	51,3 "
" (dto.+100µl Cu(Phe))	167,2	163,0	399,1	531,2	51,2 " 171 %

a: prozentuale Intensität der Nebenlinien (S 2p) oxidierter Schwefelspezies bei 166 und höher.

sind oder Sulfationen als Verunreinigung im Präparat enthalten sind. Eine Positivierung kann durch die Bindung des Methioninliganden an das Hämeisen im oxidierten Zustand eintreten. Oxidative Prozesse sind an allen Thioäthern möglich. Die Umwandlung des hämgebundenen Methionins zum Sulfoxid auf photochemischem Wege ist bekannt (112).
Das Cyanoderivat des Cytochrom C wurde dargestellt, da die hämgebundene Cyanogruppe den Methioninliganden aus der Fe-S-Bindung verdrängt. Um das Cyanoderivat des Cytochrom C zu erhalten, wurden 1 mg/100 µl Cytochrom C in 10 mMol/l flüchtigem Ammoniumkarbonatpuffer pH 7,0 mit einer neutralisierten KCN-Lösung versetzt bis zu einer CN-Konzentration von 0,08 Mol/l. Die eisgekühlte Lösung wurde flüssig auf einen Tesafilmprobenträger aufgetragen und in der Arbeitskammer des Photoelektronenspektrometers evaporiert. Es wurden Spektren erhalten, die S 2p-Signale bei 167,7, 164,3 und 162,4 eV im Verhältnis 3:1:1 enthielten. Dies deutet darauf hin, daß das Cyanid vor oder während der Messung Oxidationsprozesse einleitet, die den vorhandenen Schwefel überwiegend in den 4- und 6-wertigen Zustand oxidieren; die Signale können Sulfonen der proteingebundenen Thioäther entsprechen. Diese Befunde stehen im starken Gegensatz zu röntgenphotoelektronenspektroskopischen Messungen an Cyanoderivaten des Cytochrom C, bei denen keine Satelliten bei höherer Bindungsenergie als 162,8 beobachtet wurden (113).
Um Cytochrom C in vollständig reduziertem Zustand - Sulfoxide eingeschlossen - zu erhalten, wurde eine Lösung von 1 mg Cytochrom C / 100 µl Puffer mit 100fachem Überschuß

Ascorbat versetzt, sowie Cytochrom C an einer reduzierten Thiosepharose 6B-Säule chromatographiert. In diesen Fällen konnten vorhandene Satelliten mit einer Intensität von 30 % nicht reduziert werden, sondern allein die Tatsache, daß das Protein in sauerstoffgesättigten Puffern gelöst ist, schien auszureichen, um Oxidationsreaktionen auszulösen, deren Reaktionsmechanismus möglicherweise über radikalische Sauerstoffspezies, wie z.B. Superoxid und OH-Radikale, abläuft. Die Reduktionsmittel haben nur Einfluß auf das Ausmaß der Oxidation in Lösung, können diese jedoch nicht verhindern. Ascorbatbehandelte Cytochrom C-Lösung zeigt ein Verhältnis der S 2p-Linien bei 167,4 und 162,8 von 1:1, während Cytochrom C nach Thiosepharose 6B-Chromatographie, die für SH-Gruppen spezifisch ist, ein Verhältnis von 5:1 zeigte.

4.1.3.2. Myoglobin

Myoglobin aus Pferdemuskel, ein Hämprotein, welches Schwefel ausschließlich in Form zweier Methioninreste in den Positionen 55 und 131 enthält (25), kann als Modellprotein zur Untersuchung proteingebundener Thioäthergruppierungen dienen. Es wurden daher die S 2p Röntgenphotoelektronenspektren aufgenommen. Das käufliche Präparat zeigte Signale bei 162,8 eV und 166,1 eV im Verhältnis von 8:6. Nach nochmaliger Messung, nachdem 20 Min. $MgK_{\alpha 3,4}$-Strahlung eingewirkt hat, kehrte sich das Verhältnis der beiden Signale

um und lag nun bei 5:6. Es hat den Anschein, als ob die Methioninreste bereits zu Beginn der Messung z.T. als Methioninsulfoxide vorliegen. Die MgK_{α}-Strahlung in Gegenwart von O_2-Spuren und die Anwesenheit von Myoglobin Fe(II) beschleunigt wahrscheinlich den Oxidationsprozeß. Wird Myoglobin in Lösung (10 mg Protein/100 µl Puffer) aufgetragen, beträgt das Verhältnis der S 2p-Signale bei 162,8 und 167,6 eV bereits zu Beginn 1:2. Durch Oxidation mit 10^{-4} Mol/l Cu^{2+}(Phenanthrolin)-Lösung verschwindet das Signal bei 162,8 eV weitgehend und es treten nur oxidierte Schwefelspezies, erkennbar an ihren Signalen bei 166,1 und 167,2 eV, auf. Es muß gefolgert werden, daß Methioninreste bereits im Lyophilisat teilweise zu Sulfoxiden oxidiert sind und daß dieser Oxidationsprozeß bereits in wässriger Lösung in Gegenwart von Sauerstoff abläuft und durch Einwirkung von Oxidationsmitteln wie Kupferphenanthrolinkomplexen (114) sowie unter den Meßbedingungen bei Einwirkung weicher Röntgenstrahlung geringer Intensität (10 kV, 100 mA) verstärkt wird (Abb. 4, Tab. 2)

Abb. 4: Röntgenphotoelektronenspektren der S 2p (1/2,3/2) Doublettlinie von Myoblobin (a) sowie Myoglobin (b) nach 20 min Röntgenbestrahlung (Mg-Anode; $MgK_{\alpha 1,2}$-Strahlung; Röntgenleistung 10 kV, 100 mA) Zahl der scans: 25; Glättungsfunktion über 25 Punkte. Die übrigen Werte siehe Legende zu Abb. 1.

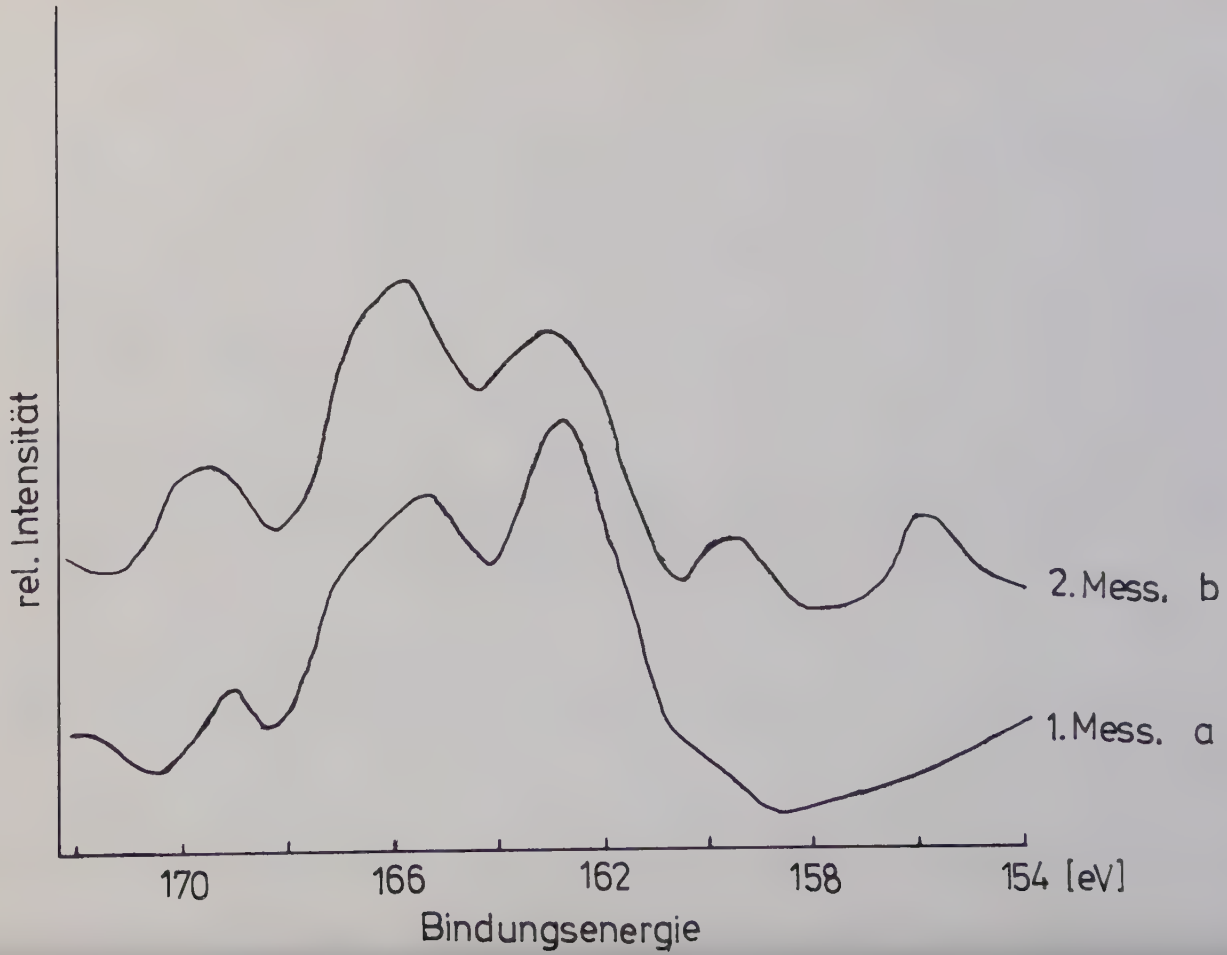

rel. Intensität
2. Mess. b
1. Mess. a
170
166
162
158
154 [eV]
Bindungsenergie

Tabelle 3: Elektronenbindungsenergien der S 2p (1/2,3/2)-Linien und zusätzliche Kalibrierungslinien (O 1s, N 1s) von Rhodanese, Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase und Papain

Verbindung	S 2p (1/2,3/2)		N 1s	O 1s	Sonstige Linien
Rhodanese mit Sulfan-S	166,4	162,6			
dto. ohne Sulfan-S	167,5	161,3			
Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase	167,8	163,4	399,3	531,5	Doppellinie 164.2/163,1 S 2p
dto. + 5 µl H_2O_2	167,9	163,8			
Papain	168,6	163,2	399,9	532,0	Linienverbreiterung bei 163,5

4.1.3.3. Rhodanese

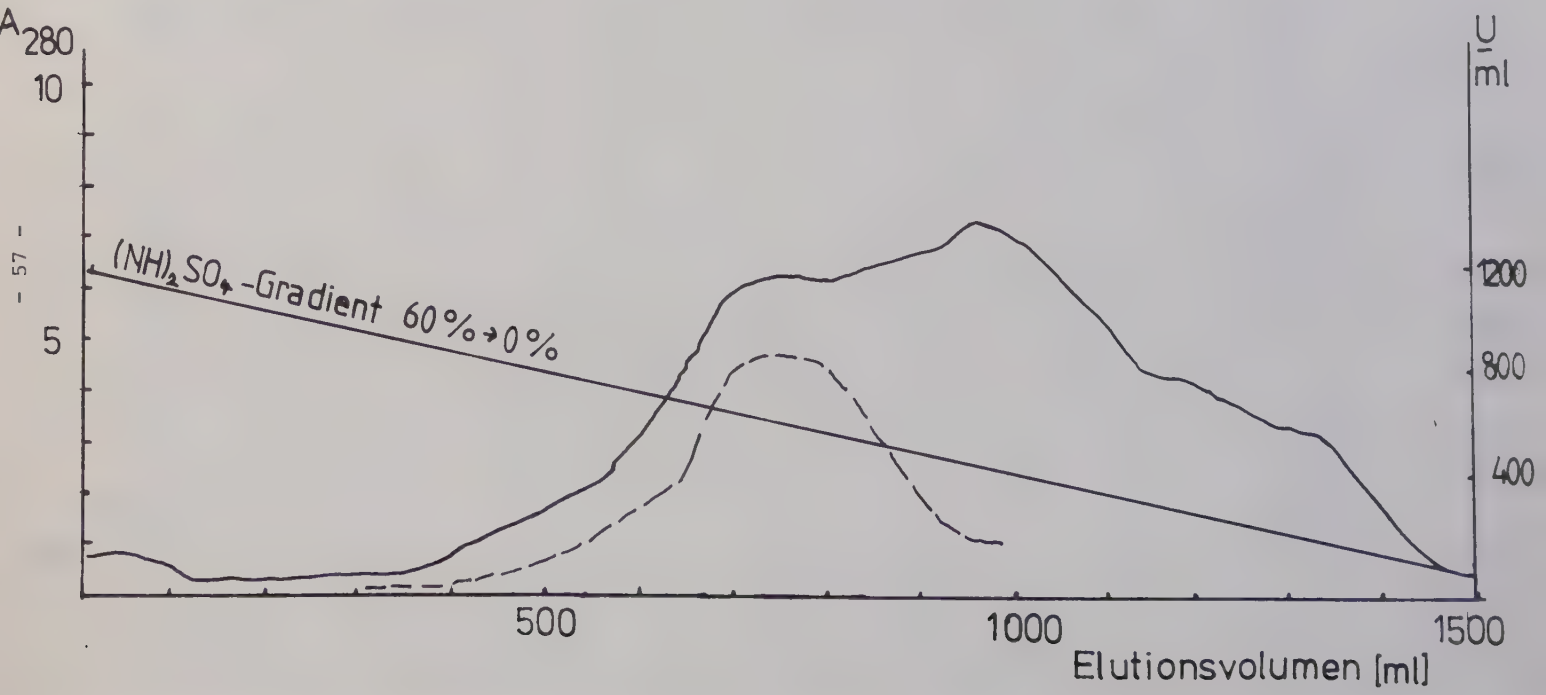
Thiosulfat-Sulfo-Transferase E.C. 2.8.2.2. mit Trivialnamen Rhodanese, welche in hohen Gewebskonzentrationen nahezu ubiquitär gefunden werden kann, ist in der Lage, Schwefel von einer großen Zahl von Donoren auf zahlreiche Akzeptoren zu übertragen (18,19). In Gegenwart von Reduktionsmitteln, wie z.B. Dithiothreitol, vermag die Rhodanese zusätzlich "in vitro" Eisen-Schwefel-Proteine zu rekonstituieren (23). Rhodanese wird hauptsächlich in der Mitochondrienfraktion gefunden und kann als Schwefelpool für Schwefel der Oxidationsstufe O angesehen werden. Rhodanese kann sowohl in schwefelbeladener Form als auch in schwefelfreier Form erhalten werden, wobei das Enzym nur in ersterer Form stabil ist und isoliert werden kann. Aufgrund von UV-Absorptionsmessungen bei 330 nm und Fluoreszenz-Löschungen wurde für das aktive Zentrum eine Persulfidstruktur vorgeschlagen (20). Um diese Strukturzuordnung röntgenphotoelektronenspektroskopisch weiter abzusichern, wurde eine Isolierung der Rhodanese aus Rinderleber vorgenommen (80).

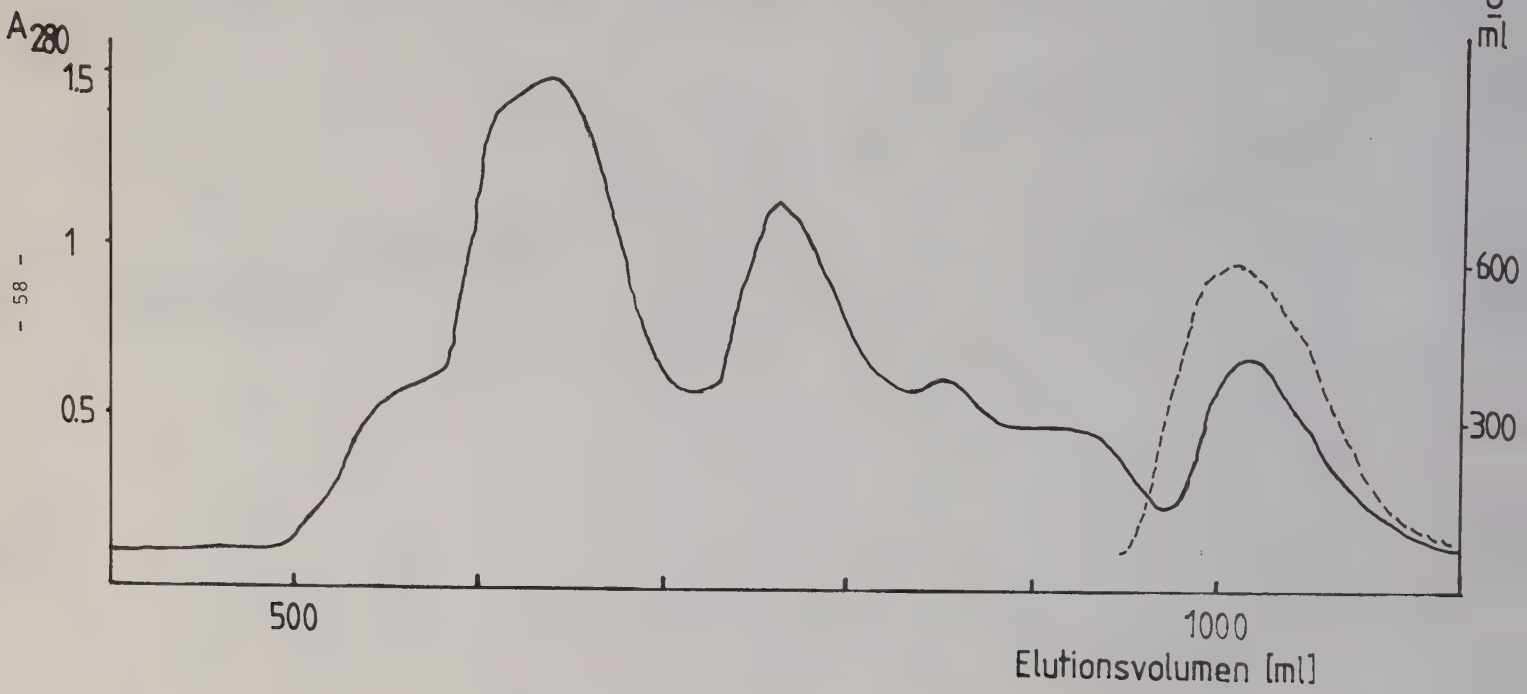
Es gelang mit der Ammonsulfatgradienten-Cellitchromatographie (89,90,91), auch Zonenchromatographie genannt, die Ammonsulfat- und pH-Fällungsschritte früherer Isolierschemata (81) durch einen einfachen chromatographischen Schritt zu ersetzen, der zudem den Vorteil hat, daß die Cellitsäule nach Spülen mit konzentrierter Ammonsulfatlösung von allen Grobteilen und braungefärbten Beimengungen des Homogenats befreit wird und eine gleichmäßige Gelbfärbung erreicht

wird (Abb. 5). Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt, die Rhodanese bei 60 % Ammonsulfatkonzentration erneut gefällt, das Zentrifugat in Kaliumphosphatpuffer aufgenommen und auf einer Sephadexsäule weiter aufgetrennt. Die Ausbeute an Rhodanese war nach der Sephadexchromatographie um 10 % höher als in (80). Die Einfachheit der Isolierschritte machen dieses modifizierte Verfahren empfehlenswert (Tab. 4, Abb. 6).

In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß bei Kristallisationsversuchen der Rhodanese im Überstand ein aggregiertes Begleitprotein beschrieben worden ist. Die Autoren konnten zeigen, daß dieses Protein labilen Schwefel unter reduktiven Bedingungen in Gegenwart von Fe^{2+}-Ionen aus dem von der Rhodanese umgesetzten Thiosulfat einbaut und möglicherweise als primäres Eisen-Schwefel-Cluster-Protein anzusehen ist (117).

Abb. 5: Elutionsdiagramm der $(NH_4)_2SO_4$-Cellit-Säule. Säulenmaße: 30 x 5 cm; linearer $(NH_4)_2SO_4$-Gradient: 60 % - 0 %, pH 5,0, 50 mM Kaliumacetatpuffer, 1 mM $K_2S_2O_3$, 90 ml/h Elutionsgeschwindigkeit (Schlauchpumpe).
—— Protein; --- Rhodaneseaktivität nach Sorbö.


A280
10
5
(NH)2 SO4 -Gradient 60%→0%
U/ml
1200
800
400
500
1000
1500
Elutionsvolumen [ml]


A280
1.5
1
0.5
U/ml
600
300
500
1000
Elutionsvolumen [ml]

4.1.3.4. Papain, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase

Aus Reaktionen von Oxidationsmitteln wie H_2O_2 und Ortho-Jodoso-Benzoat mit metallfreien Proteinen wurde geschlossen, daß in Papain und Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase stabile Sulfensäurereste entstehen (27). Die S 2p-Bindungsenergieregion wurde in den stoichiometrisch oxidierten und nativen Proteinen röntgenphotoelektronenspektroskopisch untersucht.
Korrelationen von S 2p-Bindungsenergiewerten und Strukturelementen des Schwefels lassen einen Wert von ca. 164 eV für den Sulfensäurerest erwarten. Die Spektren der S 2p-Bindungsenergieregion zeigten bereits im nichtoxidierten Zustand eine Verbreiterung der Halbwertsbreite der S 2p-Linie, die somit Signale bei 163 eV und 164 eV einschloß. Gleichzeitig konnten S 2p-Signale von höher oxidiertem Schwefel bei 166 eV beobachtet werden (Abb. 7, Tab. 3).

Oxidationsversuche mit stoichiometrischen Mengen H_2O_2 änderten das Bandenmuster nur wenig; es kam zu einer Erhöhung der Signale bei 166 eV; dies wird auf eine unspezifische Oxidation der Thiolreste zu Sulfinsäuren und Sulfoxiden zurückgeführt. Die Röntgenphotoelektronenspektren können zur Bestätigung des Auftretens einer Sulfensäuregruppie-

---

Abb. 6: Elutionsdiagramm der Sephadex G 75-Säule. Säulenmaße: 150 x 4 cm; 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,6, 1 mM $K_2S_2O_3$; 20 ml/h Elutionsgeschwindigkeit.
—— Protein; --- Rhodaneseaktivität

rung in den beiden Proteinen gedeutet werden. Es kann jedoch eine weitergehende Oxidation der Thiole zu den Oxidationsstufen +IV und +VI beobachtet werden.

4.1.3.5. Serumalbumin

Serumalbumin aus Rinderblut, Mol.Gew. 67 000, enthält pro Molekül 4 Methionin-Reste, 17 Disulfidbrücken und 1 Cysteinrest (115).Eine Katalyse der S-Oxidation durch Übergangsmetall induzierte O_2-Aktivierung (116) sollte in diesem Protein möglichst klein sein. Deshalb wurde zu Vergleichsmessungen dieses Protein gewählt. Serumalbumin zeigt ein großes Signal bei 163,0 eV und keine Satelliten im Bereich von 164 oder 166 eV. Nur bei 168 eV ist eine kleine Bande sichtbar, die wahrscheinlich auf einer Verunreinigung mit Sulfat beruht, welche auf den Herstellungsprozeß zurückzuführen ist (Tab. 2, Abb. 8). Serumalbumin als Festsubstanz vermessen zeigt somit ein typisches Proteinspektrum mit

---

Abb. 7: Röntgenphotoelektronenspektren der nicht aufgelösten S 2p (1/2,3/2) Doublettlinie von Papain (a) und Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (b). Papain wurde als Lyophilisat auf Klebeband (Scotch 3M Co) aufgetragen. GAPDH wurde in der Probenkammer des V-IEE15-Photoelektronenspektrometers auf dem Probenträger flüssig auf das Klebeband aufgetragen und lyophilisiert.
Aufnahmebedingungen: $MgK_{\alpha 1,2}$-Anode bei einer Röntgenleistung von 1100 W (100 mA, 10 kV); Zahl der scans: 25; übrige Daten wie in Abb. 2.

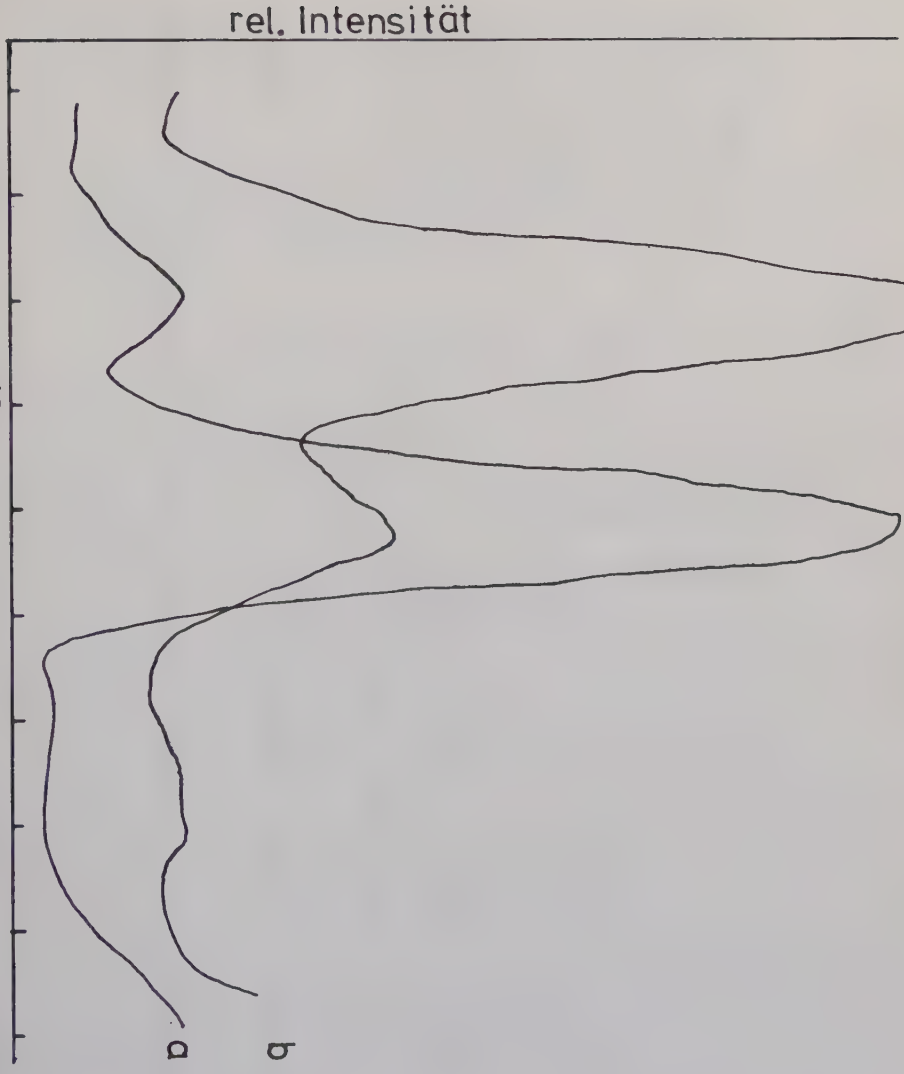

rel. Intensität
170
166
162
158
154 [eV]
Bindungs-
energie
a
b

Tabelle 4: Isolierschema der Thiosulfat-Sulfo-Transferase E.C. 2.8.1.1 aus Rinderleber

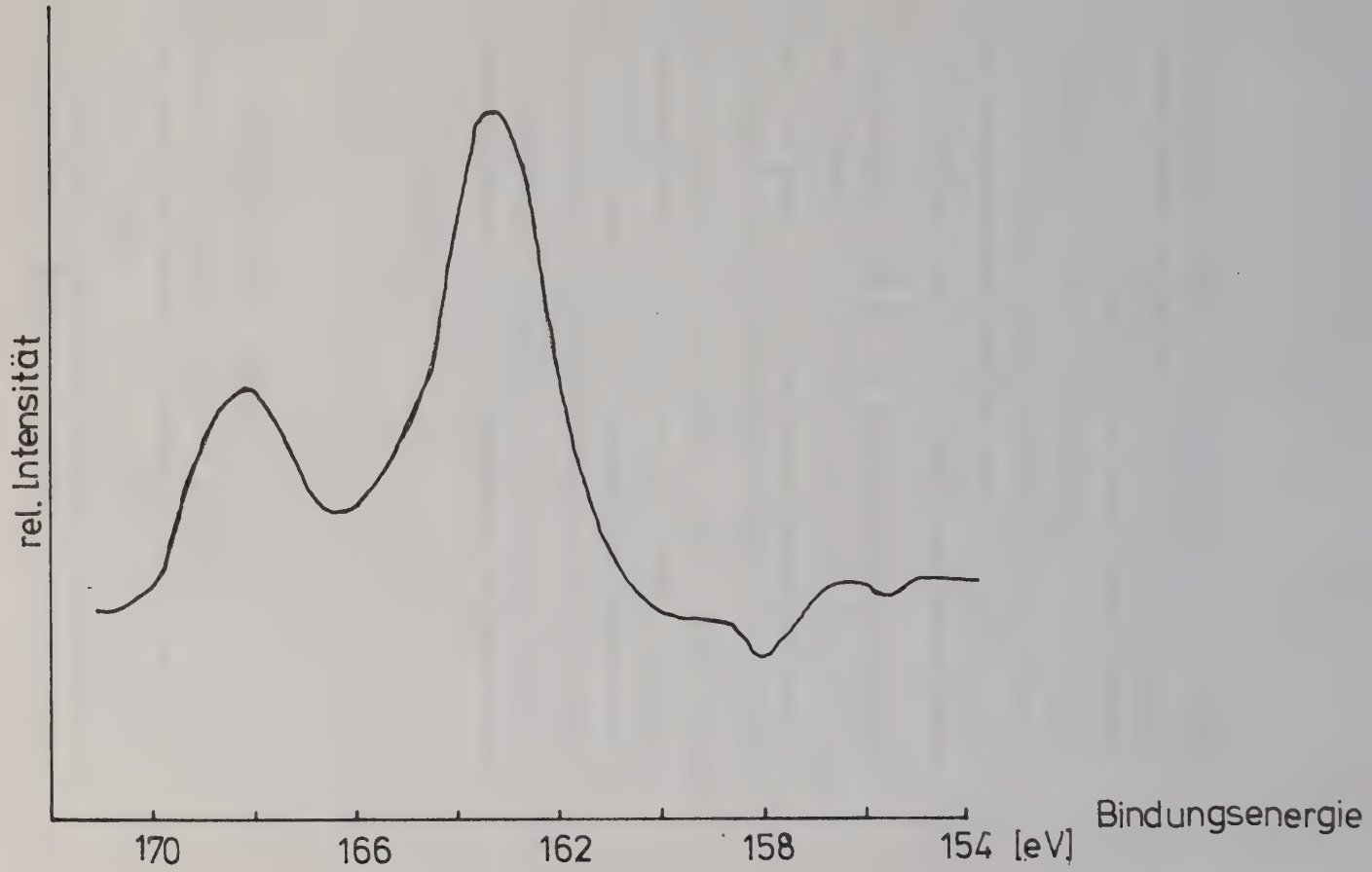
Fraktion	Volumen (ml)	Protein konz. (mg/ml)	Protein-menge	Einheiten /mg	Einheiten gesamt	Einheiten /ml	Ausbeute (%)
Rohhomogenat pH 5,5	100	560	56000	2,81	157400	1574	100
Pool nach Ammon-sulfat-Cellitchrom.	300	47	14040	7,95	116618	374	74
Auftragsvolumen auf Sephadex G 75	35	180	6300	5,83	43050	1230	29
Pool nach Sephadex G 75 Lauf	200	4,3	860	79	68000	340	43
Umkristallisation nach Sorbø				110			

einem einzigen Peak bei 163,0 eV, der von Methionin und Cystin-Schwefel herrührt. Oxidierte Schwefelspezies sind nicht nachweisbar. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, daß sowohl bei Cytochrom C wie Myoglobin der jeweilige Schwefel durch Fe(II)-induzierte O_2-Aktivierung (z.B. O_2^-, ·OH oder O_2^{2-}) oxidiert wurde.

4.1.3.6. Thioneine

Metallothioneine mit 30 % Cysteinanteil und Metallatomen, die im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 an die Schwefelatome gebunden sind, waren aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts und ihrer relativ einfachen Aminosäurenreste-Zusammensetzung für röntgenphotoelektronenspektroskopische Untersuchungen sehr gut geeignet (13,16). Homogene Thioneine zeigten in Abhängigkeit vom Metallatom unterschiedliche S 2p-Werte (17,15). Die Einheitlichkeit der jeweiligen S 2p-Banden ist ein Hinweis auf ähnliche Metall-Schwefelbindungen in den 8 - 12 Bindungszentren der Thioneine.

Es ist bemerkenswert, daß in Metall-Schwefelverbindungen die Kernelektronenniveaus der Metalle bei Redoxwechseln im allgemeinen konstante Werte aufweisen. Eine Ausnahme stellt der Cu(I) - Cu(II) - Übergang dar. Die S 2p-Bindungsenergiewerte jedoch zeigen relativ große chemische Verschiebungen von bis zu 1,5 eV; bei Oxidation mit stoichiometrischen Mengen H_2O_2 werden zusätzlich Signale bei


rel. Intensität
170
166
162
158
154 [eV]
Bindungsenergie

164 eV und 166 eV gefunden, die oxidierten Schwefelspezies wie z.B. Cu(I)-S^{+}-R, Sulfensäure und Sulfinsäure zugeordnet werden können.

4.2. Selen

4.2.1. Anorganische Selenverbindungen

Die Elektronenbindungsenergien der Se 3d (3/2,5/2) Linie einer Reihe von anorganischen Selenverbindungen sind in Tabelle 5 zusammenfefaßt. Die maximale chemische Verschiebung zwischen den Oxidationsstufen -2 und +6 beträgt 7,5 eV. Das bedeutet im Vergleich zu anderen Elementen eine relativ große Verschiebung im Verhältnis zur Linienbreite (7:1), wie sie analog bei Schwefelverbindungen beobachtet werden kann. Ebenso wie beim Schwefel korrelieren beim Selen die Paulingschen q-Werte und damit die Ladungsdichte sehr gut mit den Bindungsenergiewerten (63,64). Obwohl die Ladungsdichte nicht den einzigen Faktor darstellt, der die chemische Verschiebung beeinflußt, kann doch rein empirisch eine Zuordnung von Oxidationsstufe zur Bindungsenergie getroffen werden, bei der jeweils ca. 2 eV einem Schritt von 2 Oxidationsstufen entspricht.

Abb. 8: Röntgenphotoelektronenspektren der S 2p (1/2,3/2) Doublettbande von Serumalbumin. Das Lyophilisat wurde auf Klebeband (Scotch 3M Co) am Probenträger aufgetragen.

Tabelle 5: Elektronenbindungsenergien der Se 3d (3/2,5/2)-Linien einiger anorganischer Selenverbindungen und Selenotrisulfide

Anorganische Selenverbindungen	Se(3d 3/2,5/2) (eV)	Partial-ladung	Oxidations-zahl
CdSe	53,3		-2
PbSe	53,3	-0,09	-2
Selenoharnstoff	53,6		0/-1
NaHSe	53,8		-2
K_2SeSO_3	54,0		-2
KSeCN	54,3		0
SnSe	54,2	-0,08	-2
As_2Se_3	54,5	-0,09	-2
Ag_2Se	54,7		-2
-AuSe	54,8		-2
P_4Se_4	54,9		0
NaSeCN	55,1		0
Se	54,8[a]	0	0
$Na_2SeS_4O_6$	56,1	0	+1
Na_3SeO_3	58,3[a]	1,04	+4
SeO_2	59,1[a]	1,04	+4
Na_2SeO_4	60,8	1,31	+6
Selenotrisulfide			
Selenodimercapto-äthanol	55,4	0	+2/3
Selenodidodekanthiol	55,4, 58,3	0	+2/3
Selenodi-N-Acetyl-cystein	55,5	0	+2/3
Selenodipenicillamin	55,6	0	+2/3

a) siehe (118)

4.2.2. Selen-Verbindungen als Modelle von Selenoproteinen

Die große chemische Verschiebung der Selen 3 d Linie erlaubt die Zuordnung von Ladungsdichten des Selen in Selenoaminosäuren und Selenopeptiden (118). Es wurden deshalb Bindungsstudien von Selenit an thiolreiche Verbindungen vorgenommen, um das Redox-Verhalten von Selen und Schwefel in diesem Modellsystem zu studieren. Bei der Reaktion von 1 Mol Selenit mit 4 Molen Thiolverbindung bei niedrigen pH-Werten kommt es bevorzugt zu Selenotrisulfidbildung. Es wurden deshalb frisch bereitete Selenotrisulfide von Mercaptoäthanol, Dodekanthiol, N-Acetylcystein und d-Penicillamin röntgenphotoelektronenspekroskopisch gemessen (Tab. 5, Abb. 9).

Da nur im Fall des d-Penicillamins ein kristallines Reaktionsprodukt isoliert werden konnte, wurden die Reaktionsgemische der anderen Thiole nach vollständiger Reaktion untersucht. Im Fall des Dodekanthiol lag das Gleichgewicht der Reaktion nicht gänzlich auf der Seite der Selenotrisulfidbildung, sodaß auch das Signal der Ausgangsverbindung Selenit beobachtet werden konnte. Die Selen 3d Bindungsenergien der Selenotrisulfide liegen durchgehend im Bereich von 55,4 bis 55,6 eV und liegen somit innerhalb der Standardabweichung. Die Selen 3d Bindungsenergiewerte stimmen mit denen des elementaren Selen und Selenomethionin überein (118).

Die Frage nach der Oxidationsstufe des Selen in Selenotrisulfiden, die formal Werte zwischen -2 und +2 annehmen kann, muß nach den vorliegenden Daten in die Nähe von +1

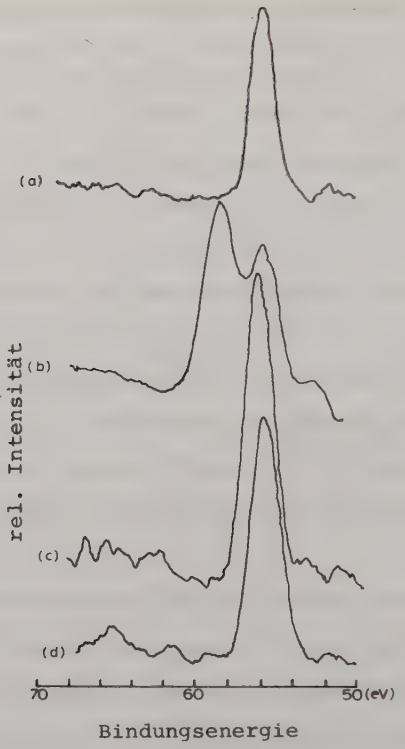


Abb. 9: Röntgenphotoelektronenspektren der unaufgelösten Doublettlinie der Se 3d (3/2,5/2) Elektronenbindungsenergien von niedermolekularen Selenotrisulfiden. Alle Proben, ausgenommen das kristalline Selenodipenicillamin, wurden direkt auf dem Probenstab lyophilisiert (in der Probenkammer des V-IEE15 Photoelektronenspektrometers).
a) Selenodimercaptoäthanol (17 µMole)
b) Selenodidokanthiol (17 µMole). Man beachte die unvollständige Reaktion! Die Bande bei 58,3 eV entspricht Selenit
c) Selenodi-N-Acetylcystein (16,6 µMole)
d) Selenodipenicillamin (8 µMole)
Die Röntgenquelle war eine Mg-Anode bei einer Röntgenleistung von 1100 Watt (11 kV, 100 mA); die Analysatorenergie betrug für a,c,d: 50 eV, für b: 100 ev; work function: 6 eV; sweep width: 20 eV; Zahl der scans: a=2, b=3, c=7 und d=3; die Glättungsfunktion wurde bei a und c über 15 Punkte, bei b und d über 25 Punkte gelegt.

gerückt werden. Werden die organischen Thiolreste in Selenotrisulfiden durch Thiosulfatreste ersetzt, wie in Natriumselenopentathionat, so steigt die Se 3d Bindungsenergie auf 56,1 eV (Tab. 6).

Tabelle 6: Elektronenbindungsenergien der Se 3d(3/2,5/2)-Orbitale in verschiedener chemischer Umgebung.

Verbindung	Strukturelement	Se(3d 3/2,5/2) (eV)
Selenomethionin	C-Se-C	55,1[a]
Selenocystin	C-Se-Se-C	55,2[a]
Selenocystin	C-Se-S-C	55,3[a]
Selenodipenicillamin	C-S-Se-S-C	55,6
Natriumselenopentathionat	SO_3-S-Se-S-SO_3^{1-}	56,1

a) siehe (118)

Aufgrund der Flüchtigkeit des Reaktionsprodukts (H_2O) ist H_2O_2 als Oxidationsmittel gut geeignet, um Protein-gebundenes Selen im Hochvakuum zu oxidieren. Die Oxidation von Selenodi-N-Acetylcystein mit H_2O_2 wurde als Modellreaktion zur Untersuchung der Oxidationsstufen des Selen mit der Röntgenphotoelektronenspektroskopie herangezogen. Zu jeweils einer Probe Selenodi-N-Acetylcystein wurden schrittweise 88, 176, 220, 264 und 440 µMole H_2O_2 zugefügt.

Mit zunehmender H_2O_2-Konzentration verschwand das Signal bei 55,5 eV und ein Signal bei 59,0 eV, dem Selen IV zuzuordnen, trat auf. Es konnten keine Signale beobachtet werden, die intermediären Oxidationsstufen des Selens zugeordnet werden konnten. Bei gleicher Höhe der beiden Signale war das Verhältnis von Selen zu H_2O_2 1:13. H_2O_2 reagiert sicherlich auch mit anderen Elementen wie z.B. Schwefel, da Selen IV erst relativ spät in meßbarer Menge entsteht (Tab. 7, Abb. 10).

Tabelle 7: Elektronenbindungsenergien der Se 3d(3/2,5/2)-Elektronenniveaus des oxidierten Selenodi-N-Acetylcystein und des Selenothionein

Verbindung	Se 3d(3/2,5/2) (eV)	
Selenodi-N-Acetylcystein (μMol H_2O_2 hinzugefügt)		
0	55,5	-
88	55,5	58,5
176	55,5	58,7
220	56,0	59,0
264	56,0	59,1
440	-	59,0
Selenothionein	55,5	-
Selenothionein oxidiert mit 8 Mol H_2O_2 pro Mol Se	55,5	58,7

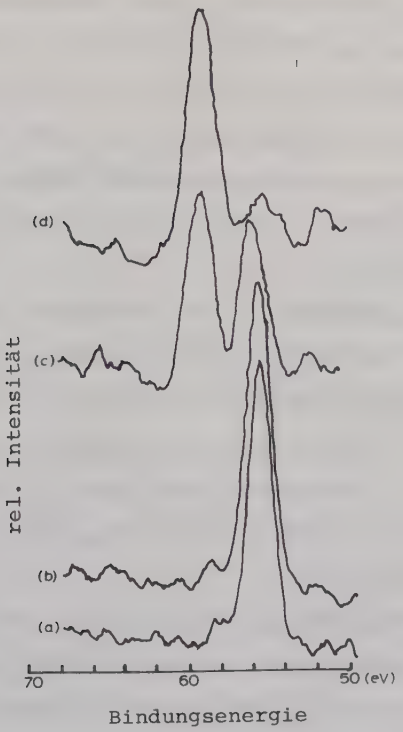


Abb. 10: Röntgenphotoelektronenspektren der Se 3d(3/2,5/2) Elektronenniveaus von Selenodi-N-Acetylcystein, das mit steigenden Mengen H_2O_2 titriert wurde (µMole). a) 88; b) 176; c) 220; d) 440. Das Reaktionsgemisch wurde direkt auf den Aluminium-Probenträger aufgetragen. Probenauftrag und weitere technische Details siehe Abb. 9 und Methoden 3.2.6. Die Spektren wurden nach Reaktionszeit von 10 min sofort aufgenommen. Zahl der scans: 5; die Glättungsfunktion wurde über 15 Punkte für die Spektren c,b,c und über 25 Punkte für die Spektren d,e gelegt.

Die anderen Selenotrisulfide zeigten analoge Reaktionen mit H_2O_2 bis auf das Selenodipenicillamin. Dieses zeigte bei Oxidation mit H_2O_2 nur eine geringe Verschiebung von 0,5 eV zu höherer Bindungsenergie des Se 3d-Wertes. Die Oxidationsreaktion wird möglicherweise durch sterische Behinderungen von seiten der dem Schwefel benachbarten Methylgruppen gehemmt.

Da das Reaktionsprodukt von 4 Molen d-Penicillamin und 1 Mol Selenit außergewöhnliche Eigenschaften zeigte, wie Kristallisierbarkeit, Stabilität bei höheren pH-Werten, selbst bei pH 7, rel. Stabilität gegenüber H_2O_2, wurde diese Verbindung auf Homogenität überprüft und analytisch näher untersucht (Elementaranalyse, Circulardichroismus und Ultraviolettabsorption).

Kristalle von Selenodipenicillamin in 20 µl H_2O gelöst wurden einer Dünnschichtchromatographie an Silicagelplatten in 1-Butanol-Eisessig-H_2O (2:1:1) unterzogen. Nach Anfärbung mit Ninhydrin konnte eine große schneller wandernde Bande gesehen werden, die dem Selenodipenicillamin aufgrund ihres Selengehalts zugeschrieben wurde,und eine langsamer wandernde Bande geringerer Intensität, die durch eine Vergleichsprobe als Penicillamindisulfid identifiziert werden konnte. Es konnte nicht entschieden werden, ob das Penicillamindisulfid eine Verunreinigung darstellt oder äquimolares Reaktionsprodukt ist. Die Elementaranalyse ergab für Selenodipenicillamin folgende Werte: C = 40,88, H = 5,7, N = 7,02, S = 17,12. Diese Werte entsprechen folgender Summenformel: $C_{10}H_{20}O_4N_2S_2Se \times H_2O$. Es muß offen

bleiben, ob das H_2O-Molekül als Kristallwasser gebunden ist oder ob ein Sauerstoffatom an anderer Stelle kovalent gebunden ist. Das UV-Spektrum des Selenodipenicillamins zeigt bei 292 nm eine breite Absorptionsbande mit einem ε_{292} von 550. Dieser UV-Bande entspricht ein positiver Cottoneffekt bei 315 nm im CD-Spektrum. Da das Selen 3d-Signal von 55,6 eV eine Selenoxidverbindung ausschließt, muß aufgrund der vorliegenden Daten davon ausgegangen werden, daß unter diesen Reaktionsbedingungen hauptsächlich Selenodipenicillamin nach folgender Gleichung auskristallisiert:

$$4\ RSH + 1\ SeO_2 \longrightarrow RSSeSR\downarrow + RSSR + 2\ H_2O$$

Die relativ hohe Stabilität des Selenodipenicillamins bei physiologischen pH-Werten, durch die sterisch behinderten Thiolgruppen, ähnlich wie beim Selenodiisobutyrat beobachtet (119), könnte eine Störung des reduktiven Selenstoffwechsels bewirken, da dieser ebenfalls die Stufe des Selenotrisulfids in Form des Glutathionselenotrisulfids durchlaufen soll (110,120). Dadurch könnte das Selen durch die feste Bindung an das Penicillamin dem Stoffwechsel entzogen werden und vermehrt ausgeschieden werden. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß nach Penicillamintherapie an Ratten niedrigere Selenwerte in Leber- und Nierengewebe gefunden wurden (121).

4.2.3. Selenproteine

4.2.3.1. Glutathionperoxidase

Arbeiten an der Glutathionperoxidase, die ein Signal der Se 3d-Linie bei 54,4 eV einem Selenol- oder Selenolderivatrest und ein Signal bei 58,0 eV einem Seleninyl- bzw. Selenonylrest zuordneten, wobei diese chemische Verschiebung durch Zugabe der Substrate H_2O_2 und durch Glutathion reversibel ausgelöst werden,konnten durch neue Messungen modifiziert werden (54).
Es ist bekannt, daß die Glutathionperoxidase in oxidierter und reduzierter Form vorliegt (54). Die beiden Redoxzustände unterscheiden sich durch ihre Reaktivität gegenüber den Thiolreagenzien Jodessigsäure und Jodacetamid (143,144).
Der oxidierten Glutathionperoxidase konnte ein Selen 3d-Bindungsenergiewert bei 56,0 eV zugeordnet werden (Abb. 11, Tab. 8). Dies deutet auf einen weiteren intermediären Oxi-

---

Abb. 11: Röntgenphotoelektronenspektrum der Se 3d(1/2,3/2)-Bande von Glutathionperoxidase (oxidiert). Die Probe wurde als Lyophilisat - mit einem Zusatz von 0,5 % Lactose zur Lyophilisierung - auf Klebeband (Scotch 3M Co) aufgetragen. Neben der Se 3d-Linie bei 56 eV sind außerhalb der Se 3d-Bindungsenergieregion (60 eV - 53 eV) die Na 2s- und Mg 2p-Banden sichtbar.
Aufnahmebedingungen: $MgK_{\alpha 1,2}$-Röntgenanode bei 1100 Watt Röntgenleistung. Zahl der scans: 25, work function: 4,6 eV, Analysatorenergie: 100 eV; übrige Daten siehe Abb. 2. Glättungsfunktion über 25 Punkte.

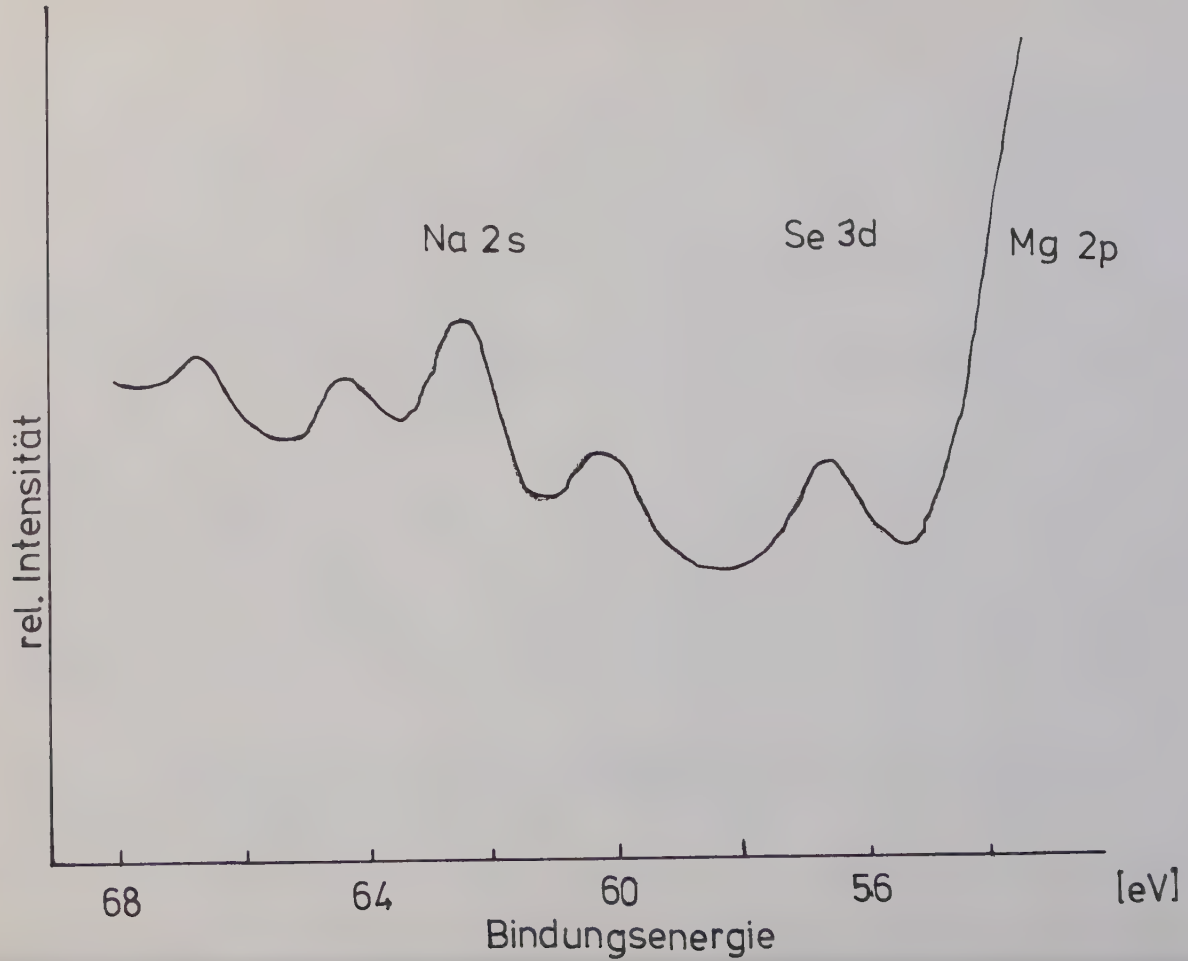

Na 2s
Se 3d
Mg 2p
rel. Intensität
68
64
60
56
[eV]
Bindungsenergie

Tabelle 8: Elektronenbindungsenergien der Se 3d (3/2,5/2), S 2p (1/2,3/2) und Se 3p (3/2,5/2) Niveaus von Glutathionperoxidase und Selenorhodanese

Verbindung	S 2p (1/2,3/2)		Se 3d (3/2,5/2)		sonstige Linien
Glutathionperoxidase (lyoph.) teilweise oxidiert	167,9	163,8	56,4	54,0	62,4 Na 2s 51,5 Mg 2p
Glutathionperoxidase + H_2O_2	167,5	163,3	57,9	54,7	399,4 N 1s 51,7 Mg 2p
Selenorhodanese (nicht stabil unter Meßbedingungen, elementares Selen ausgefallen)	167,5	161,0	56,6	54,4	399,6 N 1s

dationszustand dieses Proteins hin, der im Bereich von +I und +II liegt. Dieser Bindungsenergiewert könnte mit einer Selenenyl- bzw. Thioseleninatgruppierung vereinbart werden, der auch möglicherweise bei der enzymatischen Reaktion durchlaufen wird. In den früheren Messungen kann der Überschuß von H_2O_2 von 300:1, bezogen auf Selen, als unphysiologisch hoch angesehen werden (54).
Einen Zweielektronenübergang, der bei einem Redoxwechsel vom reduzierten zum oxidierten Enzym erwartet werden muß, entspricht hier eine chemische Verschiebung von ca. 2 eV. Die Mg 2p-Linie bei 51,5 eV liegt außerhalb des Meßbereichs aller gemessenen Selenverbindungen und vermag nicht zu stören, obwohl sie sich ebenso wie die Na 2s-Linie bei 62,5 eV nie völlig durch Entsalzung der Proben eliminieren ließ. Die Na 2s-Linie kann bei sehr hohen Natriumkonzentrationen stören durch den um 8,5 eV zu niedrigeren Bindungsenergien verschobenen $MgK_{\alpha 3,4}$-Röntgensatelliten.

4.2.3.2. Selenometallothionein

Selen vermag an freie SH-Gruppen in Proteinen wie z.B. reduzierter Ribonuclease zu binden und Selenotrisulfide und/oder Perselenide auszubilden (145). Die Reaktion läuft bei einem stöchiometrischen Verhältnis von SH/Se bei pH 4 ± 0,5 ab. Die chemische Stabilität kann stark variieren und wird von der chemischen Umgebung der Thiolgruppe beeinflußt.

Thionein, ein besonders thiolreiches Protein, vom Mol.Gew. 6000 aus Rattenleber isoliert und ungefähr 30 % Cysteinreste enthaltend, sollte ein ähnliches Reaktionsverhalten gegenüber Selenit aufweisen. Frisch präpariertes Zinkthionein wurde in das Apoprotein überführt und 1 Mol Selenit wurde auf 4 Mole Thiolreste des Thionein zugefügt. Das gereinigte entsalzte und eingeengte Reaktionsprodukt zeigte eine Se 3d-Linie bei 55,5 eV; dies ist mit einer Selenotrisulfidgruppierung vereinbar.

Die Bildung von Thiolperseleniden in Gegenwart von überschüssigen Reduktionsäquivalenten kann nicht vollständig ausgeschlossen werden (122,123).

Selenotrisulfide, im Vergleich zu Disulfidchromophoren, zeigen eine Absorptionsbande im Bereich von 280-340 nm. Diese Absorption im UV reicht jedoch nicht aus, um eindeutig Selenotrisulfide nachzuweisen. Zusätzliche Bindungsenergiewerte können mit einer Se 3d-Linie zwischen 55,4 und 55,6 eV eine Selenotrisulfidbildung wahrscheinlich machen. Nur elementares Selen, mit gleicher Bindungsenergie, kann in diesem Fall stören. Bei Zugabe von H_2O_2 zu Thioneinselenotrisulfid erschien eine zweite Se 3d-Linie bei 58,5 eV charakteristisch für Se(IV)-Verbindungen.

Um zu entscheiden, ob das Selen nach der Oxidation immer noch proteingebunden ist, wurde das Produkt auf einer Sephadex G 25-Säule aufgetrennt. Zwei klar unterschiedene Banden konnten beobachtet werden, von denen die erste das Selenotrisulfid (Se 3d = 55,4 eV) enthielt, während die zweite kein Selensignal zeigte. Selenit konnte in der Salz-

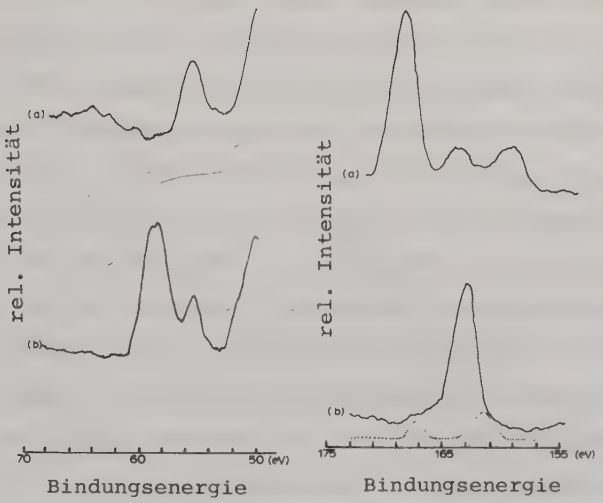


Abb. 12: Photoelektronenspektren der unaufgelösten Doublettlinie des Se 3d(3/2,5/2)Elektronenniveaus.
a) Thioneinselenotrisulfid (230 µg Se)
b) oxidiertes Thioneinselenotrisulfid (115 µg Se)
Das Reaktionsgemisch wurde direkt auf den Probenträger aufgetragen. Der Probenträger wurde mit flüssigem Stickstoff gekühlt.
Aufnahmebedingungen: Röntgenleistung: 1100 W, $MgK_{\alpha}1,2$-Strahlung, work-function 6 eV, Analysatorenergie: 100 eV(um die Empfindlichkeit zu verbessern), sweep width, Zahl der Kanäle und sweep time wie in Abb. 9. Zahl der scans: Spektrum a) 16, Spektrum b) 11, Glättungsfunktion wurde über 15 Punkte gelegt.

Abb. 13: Photoelektronenspektren der unaufgelösten Doublettlinie des S 2p(1/2,3/2)Elektronenniveaus. Oxidiertes Thioneinselenotrisulfid wurde in zwei Fraktionen mit Hilfe einer Sephadex G 25-Gelchromatographie aufgetrennt.
a) vollständig oxidiertes Thionein ohne Selengeh.
b) Thioneinselenotrisulfid; die Bindungsenergieniveaus des aufgelösten Se 3p(1/2,3/2) (gepunktete Kurve) ist angedeutet.
Aufnahmebedingungen: Analysatorenergie 100 eV; Zahl der scans: 10, weitere Bedingungen siehe Abb. 9.

fraktion nachgewiesen werden. Folglich ist der Selenanteil von H_2O_2 oxidiert worden. Zusätzlich wurden im selenfreien Thionein durch H_2O_2 die Thiolreste teilweise oxidiert. Da Selen abwesend war, konnte ohne gegenseitige Interferenz mit den Se 3p 1/2 3p 3/2 Doublettlinien die S 2p-Region untersucht werden. Es konnte das gleichzeitige Erscheinen dreier Signale bei 159,5 eV, 163,7 eV und 168,3 eV festgestellt werden, die dem Thiol-, Disulfid- und Sulfonsäure-Schwefel zugeordnet werden können (124). Das S 2p-Signal des Thioninselenotrisulfids war dagegen mit den Se 3p-Signalen vermengt (gestrichelte Kurve), zeigte jedoch keine Aufspaltung durch Schwefelspezies höherer oder niedrigerer Oxidationsstufen (Abb. 12/13). Die biologische Bedeutung der Selenothioneinbildung "in vivo" ist noch weitgehend unklar. Es muß daher Spekulation bleiben, ob die antagonistische Wirkung von Selenit- und Schwermetallionen durch die direkte Reaktion von Selenit mit Thioneinen auf molekularer Ebene vermittelt wird (125).

4.2.3.3. Selenorhodanese

Selenorhodanese wurde weitgehend nach (83) dargestellt. Durch Dialyse der schwefelbeladenen Rhodanese gegen einen 20fachen Überschuß an Sulfit wurde die schwefelfreie Rhodanese hergestellt. Diese wurde auf einer Bio-Gel P30 Säule in 100 mMol/l Ammonsulfat pH 8 auf Einheitlichkeit überprüft. Nach Umsetzung mit einem Gemisch von $SeSO_3^{2-}/SO_3^{2-}$ im

Verhältnis von 2,5:1 bei einem 10fachen Überschuß von $SeSO_3$:Protein wurden die Reaktionsprodukte auf einer Bio-Gel P2 Säule, mit 100 mMol/l Ammonsulfat pH 9 äquilibriert, getrennt. Das Elutionsdiagramm zeigte 3 Banden. Diese wurden enzymatisch und analytisch nach Sorbø (82) untersucht (Tab. 8). Es zeigte sich, daß die Rhodanese unter den obigen Reaktionsbedingungen (vermutlich aufgrund des hohen, jedoch unentbehrlichen Sulfitanteils weitgehend desaktiviert wurde. Das Protein war in den ersten zwei Banden enthalten. Der Hauptanteil des Selens war nur in den Fraktionen der 3. Elutionsbande enthalten (Salzfraktion in Form des $SeSO_3^{2-}$). Der Seleneinbau in die Proteinfraktionen war gering und substöchiometrisch. Röntgenphotoelektronenspektroskopische und CD-Untersuchungen ergaben keine signifikanten Meßdaten.

5. DISKUSSION

5.1. Möglichkeiten und Grenzen der Photoelektronenspektroskopie

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie ist zur Zeit die einzige Methode, mit der erfolgreich der Ladungszustand von Schwefel und Selen in biologischen Makromolekülen "in situ" nachgewiesen werden kann. Die Information, die die Messungen an Proteinen zu liefern vermögen, sind jedoch oft komplexer Natur und wegen apparativer Limitationen nicht immer eindeutig. Da derzeit empfindlichere physikalisch-chemische Methoden zur Untersuchung proteingebundenen Schwefels und Selens nicht verfügbar sind, stellt sie eine der bisher wenigen Möglichkeiten dar, Spekulationen und Hypothesen über Elektronentransferreaktionen auf eine experimentelle Grundlage zu stellen.
Der Primärprozeß der Röntgenphotoelektronenspektroskopie besteht in einer oberflächlichen Freisetzung von Elektronen aus den Orbitalen der Kernelektronen. Die Bindungsenergie der Elektronenorbitale läßt sich aus der Differenz der eingestrahlten Photonenenergie und der gemessenen kinetischen Energie errechnen. Die kinetische Energie der Elektronen läßt sich apparativ sehr präzis (± 0,2 eV) festlegen. Die chemische Verschiebung, die speziell bei den Elementen Schwefel und Selen, die eine starke Polarisierbarkeit aufweisen, besonders hoch ist und eine Korrelation von Bindungsenergiewerten und Ladungsdichte erlaubt, ist jedoch auch von anderen Faktoren, wie

z.B. der interatomaren Relaxation, abhängig (126). Dies führt bei einigen Elementen sogar zur Umkehrung der korrelation von Oxidationszahl und Bindungsenergie. Auch Aufladungserscheinungen können neben dem kombinierten Hartree- und Madelungpotential, das anfänglich allein zu Deutungen der chemischen Verschiebung herangezogen wurde, die Linienposition beeinflussen.

Im Falle der Übergangsmetalle Cu, Ni, war es deshalb von Vorteil, Begleiterscheinungen des Primärprozesses wie shake-up und shake-off-Prozesse, die durch Energieverluste im Bereich von 3-10 eV zu Satellitenbildungen bei höherer Bindungsenergie führen, zur Charakterisierung von Elektronenzuständen auszunützen (127,128).

Die obigen einschränkenden Überlegungen zur chemischen Verschiebung müssen bei der Interpretation von Schwefel- und Selenbindungsenergiewerten zu einer vorsichtigen und differenzierten Betrachtungsweise führen. Es ist deshalb trotz der hohen Präzision der Messung und der guten Reproduzierbarkeit, die bei 0,1 eV liegt, nicht zu vertreten, chemische Verschiebungen <0,5 eV als signifikant einzuschätzen.

Geringfügige chemische Verschiebungen sind deshalb nicht notwendigerweise mit Strukturänderungen korreliert; bei unbekannter Struktur der Verbindung muß sich deshalb jede Aussage auf Ladungsänderungen, die mindestens ganzzahlig sein sollten, beschränken und erlaubt nur in Sonderfällen strukturelle Analogieschlüsse.

Da mit Hilfe der Röntgenphotoelektronenspektroskopie bis

auf H alle Elemente nachgewiesen werden können, ist ein qualitativer Nachweis von Bioelementen in biologischen Probenmaterial grundsätzlich möglich. Mit der Atomabsorptionsspektroskopie, Inversvoltammetrie und anderen Methoden lassen sich jedoch die meisten Elemente befriedigend nachweisen. Der qualitative Nachweis ist dort von Vorteil, wo in relativ kurzer Zeit eine Übersicht über die Elementzusammensetzung der Probe gefordert wird. Da die Empfindlichkeit, die von der Meßdauer abhängig ist, für verschiedene Elemente und Elementlinien unterschiedlich ist und nur in besonderen Fällen besser als 1 % w/w ist, ergeben sich Limitationen der Anwendung bei Spurenelementen in biologischem Material. Bevorzugt lassen sich Elemente der ersten Periode wie O, N, F, sowie Schwermetallionen, sowie S, Se, J als Heteroatome nachweisen. Hierbei kann der photoelektrische Querschnitt als Maß der relativen Empfindlichkeit bei der Wahl der Elementlinien herangezogen werden (129). Als Oberflächenmethode ist die Röntgenphotoelektronenspektroskopie dort erfolgreich, wo eine Anreicherung eines Elements an Grenzschichten wie z.B. Membranen oder Knochen gefunden wird (30,131).

Die Diskrepanzen, die bei den Befunden an Protein-Photoelektronenspektren aufgetreten sind, können auch durch unterschiedliche Röntgenphotoelektronenspektrometer mitverursacht sein. Das Ausmaß von Photoreaktionen in der Meßkammer ist eine Funktion der Röntgenintensität, Einstrahlungsdauer, Anzahl der freien Elektronen, die das Aufladungsverhalten des Probenträgers beeinflussen und und von der

Verwendung von Elektronenflußkanonen abhängig sind. Obwohl die Meßzeiten so niedrig wie möglich gehalten wurden, treten bei empfindlichen Strukturen bereits im Minutenbereich Veränderungen auf, die jedoch durch kontinuierliche Beobachtung der Spektren kontrolliert werden können.
Die Deutung von Photoelektronenspektren an Makromolekülen muß die Limitationen berücksichtigen, die sich aus Nachweisgrenze, geringer chemischer Verschiebung und Zuordnungsproblemen ergeben. Um Fehlinterpretationen und Spekulationen bei Proteinspektren zu umgehen, ist es daher von Vorteil, wenn unterschiedliche Ladungszustände nur eines oder weniger Heteroatome pro Proteinmolekül gemessen werden, da so Madelungpotential und innere Relaxationsenergie weitgehend als konstant angesehen werden können, die Probenaufladung sich wenig ändert und die Zuordnung der Banden eindeutig ist. Die Größe der chemischen Verschiebung kann so als Maß für erfolgten Ladungstransfer angesehen werden. Wird zudem die Empfindlichkeit der Methode berücksichtigt, die bei einem Molverhältnis von Heteroatom zu Protein von größer als 1:10000 unbefriedigend wird, so wird verständlich, daß an Selenoproteinen (54,15) und Metallothioneinen (132,133,134) die überzeugendsten Ergebnisse erhalten wurden.

5.2. Redoxzustände von Schwefel und Selen in Proteinen

Der Elektronentransport in selen- und schwefelhaltigen Proteinen konnte bisher nur unzulänglich mit Hilfe indirekter Methoden untersucht werden. Es war nicht möglich, Ladungsveränderungen an Schwefel und Selen "in situ" nachzuweisen. Die chemische Verschiebung der Bindungsenergien der S 2p und Se 3d zeigt jedoch eine gute Korrelation zwischen Bindungsenergie und Ladungszustand der Elemente. Dies erlaubt, Redoxreaktionen dieser Elemente in Proteinen und Peptiden zu verfolgen.

Signale von Proteinen in der S 2p-Bindungsenergie-Region, die bei 165-168 eV auftraten, wurden im allgemeinen dem Sulfat bzw. oxidierten Schwefelspezies zugeschrieben (135). Diese Peaks konnten bei einer großen Anzahl von Proteinen beobachtet werden, so auch im Fall des Cytochrom C (113), Plastocyanin (137,145) und Hämocyanin (138) in unterschiedlicher Intensität je nach präparativer Vorbereitung. Der Peak bei 168 eV wurde i.a. Sulfatresten aus Isolierschritten zugeschrieben, da er durch Dialyse entfernt werden kann und mit dem Wert des reinen Salzes übereinstimmt. Gegensätzliche Auffassungen sind jedoch über die Signale bei 166 eV ± 1 eV vertreten worden. Während eine Interpretation diese Signale Sulfinsäuren, Sulfoxiden oder anderen oxidierten Schwefelspezies, die fest im Proteinverband gebunden sind, zuordnet (113), wurde andererseits eine Positivierung des Schwefels in Metallmerkaptidbindungen und Thioätherhämeisenverbindungen aufgrund der Tatsache postuliert, daß ein Einelektronendefizit des Schwefels eine Ver-

schiebung von 5,6 eV erwarten läßt (136). Bei den Messungen konnte der Autor mit dem Varian-Gerät auch bei sehr sorgfältiger Präparation der Proben obige Folgerungen nicht bestätigen. Vielmehr konnte gefunden werden, daß in allen Fällen Satelliten bei höherer Bindungsenergie auftraten, die im Fall des Cyanoderivats von Cytochrom C die höchsten Werte aufwiesen. Die Ursache, daß die in der Literatur beschriebenen Befunde nicht reproduziert werden konnten, kann in präparativen Maßnahmen, die nicht näher beschrieben worden sind, oder auch in der Verwendung unterschiedlicher Photoelektronenspektrometer liegen. So wurden in einem Fall zur Unterdrückung von Aufladungserscheinungen eine Low Energy Electron Flood Gun verwendet (137). Inwieweit diese technischen Unterschiede die Spektren beeinflußt haben, kann so nicht entschieden werden. Denkbar sind oberflächliche Photoreaktionen, die zu veränderten Meßwerten in der S 2p Region führen.

5.2.1. Zum Problem S^+ oder Sulfinsäure

Obwohl die Hypothese einer partiellen Positivierung des Schwefels in sich konsistent ist, erscheinen dennoch Zweifel angebracht, da wir in nahezu alle untersuchten, auch metallthioätherfreien Proteinen Signale oxidierter Schwefelspezies gefunden haben.
Vor allem in Cytochrom C-Derivaten wie Cyano-Cytochrom C, lyophylisiertem Cytochrom C und mit Ascorbat reduziertem

Cytochrom C waren regelmäßig Satelliten höherer Bindungsenergie mit z.T. größerer Intensität als im nativen Präparat festzustellen.

Eine weitere Hypothese führt die Satelliten bei höherer Bindungsenergie auf die Charge-Transfer-Shake-Up-Prozesse zurück (127). Shake-up Prozesse entstehen bei der Elektronenemission, wenn gleichzeitig Elektronenübergänge wie z.B. 3d-4s oder Übergänge ins Valenzband mitangeregt werden. Die Energie der Übergänge liegt bei 3-5 eV und kann zu Satellitenbildung bei Bindungsenergien, die um den gleichen Betrag höher liegen, führen. Da auch den Charge-Transfer-Banden Elektronenübergänge im Bereich von 3-5 eV entsprechen, wird auch die Möglichkeit einer Mitanregung dieser Übergänge in der Art der Shake-Up-Prozesse bei Metall/Schwefel-Bindungen diskutiert. Charge-Transfer-Banden der Schwefel/Eisen-Bindungen des Cytochrom C können also auch auf diese Weise wirksam werden. Da im Zweifelsfall eine direkte Zuordnung von Bindungsenergiewerten zu strukturellen Elementen oft nicht möglich ist und die oben genannten Theorien zu den Satelliten bei höherer Bindungsenergie energetisch betrachtet zulässige Interpretationsmöglichkeiten darstellen, haben wir versucht, durch übersichtliche Oxidationsreaktionen und durch sorgfältige Beobachtung von Spektren-Veränderungen während des Meßvorgangs, Klarheit über den Einfluß der verschiedenen Variablen zu erlangen.

5.2.2. Oxidation von Schwefel mit Oxidationsmitteln

Oxidationsversuche mit H_2O_2, Reduktionsversuche mit Dithiothreitol, Ascorbat und längere Verweilzeiten in O_2-haltiger wässriger Lösung deuten daraufhin, daß die in Proteinen enthaltenen Schwefelspezies wie z.B. Thiole, Disulfide, Metallthioäthergruppierungen und Metallthiolate oxidationsempfindlich sind, besonders bei gleichzeitiger Anwesenheit von O_2, O_2^- und O_2^{2-} und Schwermetallionen. Da der vollständige Ausschluß beider Faktoren bei Proteinpräparationen nur unzulänglich möglich ist, ist die Zuordnung der S 2p-Signale höherer Bindungsenergie zu oxidierten Schwefelspezies wie z.B. Sulfoxiden als primäre Interpretation vorzuziehen und angemessen.

5.2.3. Thiole und Selenole

Thiole, die proteingebunden sind, treten vielfach im aktiven Zentrum von Enzymen auf und sind am katalytischen Prozeß beteiligt (1). Der pK-Wert der Thiole im Proteinverband unterliegt großen Schwankungen in Abhängigkeit von der chemischen Umgebung und variiert zwischen 7-10 (2). Für den röntgenphotoelektronenspektroskopischen Nachweis von Thiolen ist der Protonierungsgrad von entscheidender Bedeutung. Während das protonierte Thiol sich im Bindungsenergiewert von Thioäthern und Disulfidschwefeln nicht unterscheidet, ergeben sich für den Thiolatrest signifikante

Verschiebungen im Bereich von 162,5 eV bis 160,0 eV je nach Gegenkation, wobei Alkalimetallionen die niedrigsten Werte ergeben. Die Oxidationsempfindlichkeit der Thiole nimmt bei steigenden pH-Werten stark zu (2). Der Nachweis der Nativität von Thiolen, sofern diese bereits bei physiologischen pH-Werten teilweise ionisiert vorliegen, ist röntgenphotoelektronenspektroskopisch möglich. Da nur Persulfidschwefel und labiler Schwefel in Ferredoxinen im gleichen Bindungsenergiebereich gefunden wurden, ist die Zuordnung im allgemeinen eindeutig.
Die Zuordnung ist für Selenole bzw. Selenolderivate, wie sie in Selenoproteinen wie Glutathionperoxidase und dem Protein A der Glycinreduktase auftreten, noch eindeutiger, da nur ein Selenatom pro Proteinuntereinheit gefunden wurde. Zusätzlich kann durch Derivatisierung mit den Substraten der Nachweis der Beteiligung des Selen am katalytischen Prozeß geführt werden (54).

5.2.4. Altersbedingte Denaturierung

Die Tatsache, daß bei fast allen Proteinen Satelliten höherer Bindungsenergie auftreten und dies besonders nach längerer Verweilzeit in sauerstoffhaltiger Lösung, bedeutet, daß Oxidationsprozesse an proteingebundenen Schwefel große Ausmaße annehmen, bevor funktionelle (Enzymaktivität) und spektroskopische Effekte (UV, CD) sichtbar werden (135). Es muß davon ausgegangen werden, daß diese weitgehenden Oxidationsreaktionen am Schwefel Alterungsprozesse der Proteine

vitro darstellen, die in vivo durch hohe Thiolkonzentrationen und den abnehmenden intrazellulären Sauerstoffgradienten reduziert werden. Andere, derzeit noch nicht bekannte Schutzmechanismen spielen möglicherweise hier eine Rolle.

5.2.5. Elektronentransferreaktionen

Besonderes Interesse fanden Elektronentransferreaktionen in Metall-Merkaptidbindungen, in denen der S 2p Bindungsenergiewert einen empfindlichen Gradmesser für den Ladungszustand des Schwefels darstellt. Dies konnte bereits an niedermolekularen Metall-Schwefelverbindungen wie z.B. Nickeldithiolatkomplexen gezeigt werden (139). Bei Redoxreaktionen konnten in all diesen Fällen große chemische Verschiebungen des Thiolatschwefels nachgewiesen werden, während die Bindungsenergie der Kernelektronen der Metallzentralatome konstant blieb. Die röntgenphotoelektronenspektroskopischen Untersuchungen an Metallothioneinen und Ferredoxinen ergaben insofern gewisse Analogien, als die redoxsensitiven Komponenten jeweils die Schwefelliganden waren, während der Ladungstransfer die Bindungsenergien der zentralen Fe-, Cu-, Zn-Atome nur wenig beeinflußte (13,16,17,18). Dies kann als ein experimenteller Hinweis auf die aktive Rolle des Schwefels in Elektronentransferreaktionen verstanden werden.

5.2.6. Zur chemischen Verschiebung der N 1s-, O 1s- und der S 2p-Bindungsenergiewerte in Perchalkogenidverbindungen

N 1s-Bindungsenergiewerte wurden bei Proteinmessungen ausschließlich als zusätzliche Kalibrierungslinie verwendet, da der Peptidstickstoff in überwiegendem Maß zur N-Bande beiträgt. Es erscheint nicht zulässig, bei Proteinen und Peptiden Schlüsse auf einen möglichen Ligandcharakter der Stickstoffatome zu ziehen, wie es bei Aminosäurekomplexen sehr wohl möglich ist (140). Bei diesen können NH_2, NH_3^+ und Metallstickstoffbindungen anhand der chemischen Verschiebung zugeordnet werden (141,142).
Homologe Verbindungen eignen sich besonders gut zu röntgenphotoelektronenspektroskopischen Messungen, da bei ihnen das Madelungpotential als konstant angesehen werden kann. Insbesondere die Reihe der Perchalkogenide, die auch im biologischen Geschehen Funktionen ausübt (s.o.), ist hier von Interesse. Die homologe Reihe von ROOH, RSOH und RSeOH in Bezug auf die O 1s-Werte und die Reihe der RSOH, RSSH und RSSeH in Bezug auf die S 2p-Werte können signifikante Ergebnisse liefern. Für den O 1s-Wert ist eine Verschiebung im Bereich von 533 bis 531 eV zu erwarten, während für die S 2p-Werte eine Verschiebung von 164 - 162 eV beobachtet werden kann. Letztere S 2p-Werte konnten an Thiosepharosemodellverbindungen bestätigt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zum Verständnis des Elektronentransports im biologischen Geschehen wurden Redoxzustände von Schwefel und Selen in metallhaltigen und metallfreien Proteinen röntgenphotoelektronenspektroskopisch untersucht.

Diese spektroskopische Methode stellt neben begrenzten naßchemischen Verfahren eine der wenigen bisher erfolgreichen Möglichkeiten dar, um Ladungszustände von proteingebundenen Chalkogenen "in situ" zu bestimmen. Es wurden die S 2p, N 1s, C 1s und bei Selenoproteinen zusätzlich Se 3p und Se 3d Bindungsenergieregionen vermessen.

Besonders geeignet erschienen Proteine, die mit anderen physikalisch-chemischen Methoden bereits charakterisiert waren und deren katalytisches Verhalten eine Beteiligung von Schwefel oder Selen erwarten ließ.

Cytochrom C, Myoglobin, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, Papain, Serumalbumin, Thioneine, Glutathionperoxidase und Rhodanese wurden untersucht. Die jeweiligen Ladungszustände konnten anhand der S 2p-Signale, bzw. Se 3d-Signale festgestellt werden.

Mikrokristallines Cytochrom C und die Derivate Cyano-Cytochrom C, lyophilisiertes reduziertes und oxidiertes Cytochrom C zeigten in allen Fällen neben dem Hauptsignal bei 163 eV Satelliten höherer Bindungsenergie (165-167) von unterschiedlicher Intensität. Das größte Signal bei 166 eV wurde mit H_2O_2 oxidiertem Cytochrom C und dessen Cyanid-Komplex gefunden.

Die Leichtigkeit der Oxidationsreaktionen an proteingebun-

denem Schwefel macht die Deutung der Satelliten bei 166 eV als Sulfoxide, Sulfinsäuren und anderen oxidierten Schwefelspezies wahrscheinlicher als die Zuordnung zu einem positivierten Me-S^{+}-Schwefel.

Satelliten höherer Bindungsenergie der S 2p-Signale bei 163 eV treten ebenfalls bei Myoglobin, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, Papain, Zn-Thionein und Rhodanese auf. Das weitgehend metallfreie Serumalbumin zeigt neben einer schwachen Sulfatbande bei 168 eV keine Satellitensignale bei 165-167 eV.

Längere Röntgeneinstrahlung verursachte besonders beim Myoglobin eine Photooxidation, die zur Umkehrung des S 2p-Signalverhältnisses von 166:163 führte.

Vom Zn- bzw. Apothionein wurden Selenotrisulfidderivate dargestellt. Das proteingebundene Selen wurde einem Se 3d-Signal bei 55,6 eV zugeordnet. Dieser Wert stimmte mit den Se 3d-Bindungsenergiewerten überein, die in den Spektren niedermolekularer Selenotrisulfide von N-Acetylcystein, Dodekanthiol und d-Penicillamin gefunden wurden. Das stabile und kristalline Selenodipenicillamin erlaubte weiterführende elektronenabsorptionsspektrometrische und circulardichroitische Charakterisierungen. Seine chemische Stabilität im physiologischen pH-Bereich und seine träge Reaktivität gegenüber H_2O_2 deuten auf eine mögliche pharmakologische Beeinflussung des Selenstoffwechsels durch d-Penicillamin hin.

Negative Oxidationszustände des Schwefels bzw. des Selens wurden in Metallothioneinen und reduzierter Glutathion-

peroxidase nachgewiesen. Die S 2p bzw. Se 3d Bindungsenergiewerte konnten eindeutig Metallmerkaptid- bzw. Selenol- oder Selenolderivaten zugeordnet werden. In oxidierter Glutathionperoxidase konnte zusätzlich ein intermediärer Ladungszustand anhand eines Se 3d Signals bei 56,0 eV gefunden werden, der im Bereich von ca +II liegt.
Perselenide und Persulfide wurden in Derivaten von Cystein und d-Penicillamin sowie von Thiosepharose anhand der UV- und CD-Bandenmaxima bei 340 bzw. 370 nm nachgewiesen. Das Thiosepharosepersulfid und -perselenid zeigten Se 3d Bindungsenergieniveaus bei 54,0 eV und einen S 2p-Wert von 161,0 eV.
Während im Bereich negativer Oxidationszahlen Schwefel- und Selenoproteine signifikante Photoelektronenspektren liefern, ist in der S 2p Bindungsenergieregion die Zuordnung der Satelliten strittig.
Die Untersuchungen an metallhaltigen wie an metallfreien Proteinen machen die Bildung von Sulfoxiden und Sulfinsäuren - möglicherweise durch übergangsmetallinduzierte Redoxprozesse - plausibler als eine Zuordnung zu positiviertem Metallmerkaptidschwefel bzw. von dieser Gruppierung abgeleiteten Charge-Transfer-Shake-Up Prozessen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Kharasch, N. und Arora, A.S. (1976) Phosphorous and Sulfur 2, 1-50

2. Jocelyn P.C. (1972) "Biochemistry of the SH-Group", Academic Press, London, New York

3. Greenberg, D.M. (Hrsg.) (1975) Metabolic Pathways (Sulfur Metabolism), Academic Press, New York, San Francisco, London

4. Jung, G. und Ottnad, M. in "Themen zur Chemie des Schwefels" (1975), Hrsg.: Maas, K., Dr. Alfred Hüthig, Heidelberg

5. Lovenberg, W. (Hrsg.) (1976) "Iron-sulphur proteins", Academic Press, New York, Bd. 1, 2, 3

6. Hall, D.O., Rao, K.K. und Cammack, R. (1975) Sci. Prog. (Oxford) 62, 285

7. Gersonde, K., Schlaak, H.E., Breitenbach, M., Parak, F., Eicher, H., Zgorzalla, W., Kabrius, G.M., Mayer, A. (1974) Eur. J. Biochem. 43, 307-317

8. Kramer, E.N. und Klein, M.P. in: Shirley D.A. (1972) Electron Spectroscopy, North Holland Publ. Comp., Amsterdam, 733-751

9. Leibfritz, D. (1972) Angew. Chem. 84, 156-158

10. Gersonde K. (1978) Institutskolloquium Physiolog.-Chem. Inst. Tübingen

11. Vallee, B.L. und Ulmer, P.D. (1972) in: Annual Review of Biochemistry 41 (eds. Snell, E.E., Boyer, P.D., Meister, A. und Sinsheimer, R.L.) S. 91-128, Ann. Rev. Inc., Palo Alto, Cal., USA

12. Dissertation Sokolowski, G. (1975) Universität Tübingen

13. Sokolowski, G. und Weser, U. (1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1715-1726

14. Weser, U., Rupp, H., Donay, F., Linnemann, F., Voelter, W., Voetsch, W. und Jung, G. (1973) Eur. J. Biochem. 39, 127-140

15. Prinz, R. und Weser, U. (1975) FEBS Lett. 54, 224-229

16. Rupp, H. und Weser, U. (1974) FEBS Lett. 44, 293-297

17. Weser, U., Hartmann, H.J., Fretzdorff, A. und Strobel, G.-J. (1977) Biochim. Biophys. Acta 493, 465-477

18. Westley J. (1973) Advances in Enzymology 39, 327-368

19. Sorbö, B. (1975) in: Metabolic Pathways (Sulfur Metabolism) (Hrsg. Greenberg, D.M.), 433-456, Academic Press New York, San Francisco, London

20. Finazzi Agrò, A., Federici, G., Giovagnoli, C., Canella, C. und Cavallini, D. (1972) Eur. J. Biochem. 28, 89-93

21. Smit, J.D.G., Ploegman, J.H., Pierrot, M., Kalk, K.H., Jansonius, J.N. und Drenth, J. (1974) Israel J. of Chem. 12, 287-304

22. Bergsma, J., Hol, W.G.J., Jansonius, J.N., Kalk, K.H., Ploegman, J.H. und Smit, J.D.G. (1975) J. Mol. Biol. 98, 637-643

23. Finazzi Agrò, A., Canella, C., Graziani, M.T. und Cavallini, D. (1971) FEBS Lett. 16, 172-174

24. Margoliash, E. und Schejter, A. (1966) Adv. Protein Chem. 21, 113-286

25. Bradshaw, R.A. und Gund, F.R.N. (1969) J. Biol. Chem. 244, 2167-2181

26. Dickerson, E., Takano, T., Eisenberg, D., Kallal, O.B., Samson, L., Copper, A. und Margoliash, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1511-1535

27. Allison, W.S. (1976) Accounts of Chemical Research 9, 293-299

28. Lambeth, D.O. und Lardy, H.A. (1969) Biochemistry 8, 3395-3402

29. Massey, V., Williams, C.H. und Palmer, G. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 730-738

30. Peisach, J. und Blumberg, W.E. (1969) Mol. Pharmacol. 5, 200-209

31. Seel,F. und Simon, G. (1972) Z. Naturforsch. 27b, 1110-1112

32. Matzunaga, Y.(1959) Canad. J. Chem. 37, 994

33. Carter, C.W., Jr., Kraut, J., Freer, S.T., Alden, R.A., Sieker, L.C., Adman, E.T. und Jensen, L.H. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3526-3534

34. Margoliash, E., Dickerson, R.E. und Adler, A.D. (1972) in: The Molecular Basis of Electron Transport (Schultz, J. und Cameron, B.F., eds.) 153-177, Academic Press, New York

35. Wyard, S.J., in: "Elektronenspinresonanz und andere spektroskopische Methoden in Biologie und Medizin" (Solid State Biophysics) (1973) Akademie Verlag, Berlin, 189-210

36. Schwartz, K. und Foltz, C.M. (1957) J. Am. Chem. Soc. 79, 3292-3293

37. Andreesen, J.R. und Ljindahl, L.G. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1031-1035

38. Turner, D.C. und Stadtman, T.C. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 154, 366-381

39. Flohé, L., Günzler, W.A. und Schock, H.H. (1973) FEBS Lett. 32, 132-134

40. Whanger, P.D., Pedersen, N.D. und Werwig, P.H. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1031-1035

41. Lund, G., Biochim. Biophys. Acta (1973) 304, 76-77

42. Orme-Johnson, W.H., Hansen, R.E., Beinert, H., Tsibris,J.C.M., Bartholomäus, R.C. und Gunsalus, I.C. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 60, 368

43. Tsibris, J.C.M., Namtvedt, M.J. und Gunsalus, I.C. (1968) Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 323

44. Fee, J.A. und Palmer, G. (1971) Biochem. Biophys. Acta 245, 175

45. Wilson, G.S., Tsibris, J.C.M. und Gunsalus, I.C. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6059

46. Bowman, M., Kevan, L., Mukai, K. und Kimusa, T. (1973) Biochem. Biophys. Acta 328, 244

47. Rhead, W.J., Evans, G.A. und Schrauzer, G.N. (1974) Bioinorg. Chem. 3, 217-223

48. Ganther, H.E. (1971) Biochemistry 10, 4089-4098

49. Rupp, H., Dissertation 1976, Universität Tübingen

50. Rhead, W.J. und Schrauzer, G.N. (1974) Bioinorg. Chem. 3, 225-242

51. Michels, R., Kato, M. und Heik, W. (1976) Makromol. Chem. 177, 2311-2320

52. Flohé, L., Günzler, W.A. und Ladenstein, R. (1976) Glutathione Peroxidase in:Arias, I.M. und Jacoby, W.B. (Hrsg): Glutathione: Metabolism and Function, Raven Press, New York

53. Nakamura, W., Hosoda, S. und Hagashi, K. (1974) Biochim. Biophys. Acta 358, 251-261

54. Wendel, A., Pilz, W., Ladenstein, R., Sawatzki, G. und Weser, U. (1975) Biochim. Biophys. Acta 377, 211-215

55. Cone, J.E., Martin del Rio, R. und Stadtman, T.C. (1977) J. of Biol. Chem. 252, 5337-5344

56. Cone, J.E., Martin del Rio, R., Davis, J.N. und Stadtman, T.C. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 73, 2659-2663

57. Sawatzki, G., Wendel, A. (1975) Chemica Scripta 8a, 115

58. Siegbahn, K., Nordling, C., Fahlmann, A., Nordberg, R., Hamrin, K., Hedman, J., Johannson, G., Bergmark, T., Karlsson, S.E., Lingren, I. und Lindberg, B., ESCA-Atomic, Molecular and Solid State Structures Studied by Means of Electron Spectroscopy, Almquist and Wiksells, Uppsala, 1967

59. Siegbahn, K. et al.; ESCA Applied to Free Molecules (1969) North Holland Publ. Comp., Amsterdam

60. Lindberg, B.J. (1972) Int. J. Sulfur Chem., Part C, 7, 33-53

61. Hercules, D.M. (1976) Anal. Chem. 48, 294R-313R

62. Baker, A.D., Brisk, M.A., Liotta, D.C. (1978) Anal. Chem. 50, 328R-346R

63. Malmsten, G., Thorén, J., Högberg, S., Bergmark, J.E., Karlsson, S.E. und Rabane, E. (1971) Phys. Scripta 3, 96-100

64. Swartz, W.E. Jr., Wynne, K.J., Hercules, D.M. (1971) Anal. Chem. 43, 1884-1885

65. Jander-Blasius (1967), S. Hirzel, Stuttgart, 388

66. Anorganikum (1968) VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 712

67. Jander-Blasius (1967), S. Hirzel, Stuttgart, 393

68. Binnie, W.P., Redman, M.J. und Mallio, W.J. (1970) Inorg. Chem. 9, 1449-1452

69. Grossmann, H. und Schück, B. (1906) Z. anorg. Chem. 50, 1-21

70. Brown, B.W. und Lingefelter, E.C. (1964) Acta Cryst. 17, 254-259

71. Jander-Blasius (1967) S. Hirzel, Stuttgart

72. Klebanov, G.S. und Ostapkevich, N.A. (1962) Zh. Prickl. Kim. 35, 186-188

73. Klayman, D.L. und Griffin,T.S. (1973) J. Am. Chem. Soc. 95, 197-199

74. Brauer, G., Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie (1960) Ferdinand Enke, Stuttgart

75. Foss, Jahr (1950) Acta Chem. Scand. 4, 1562

76. Waitkin, G.R., Shutt, R. (1946) Inorg. Syn. 2, 186-188

77. Ganther, H.E. (1968) Biochemistry 7, 2898-2905

78. Klayman, D.L. (1965) J. Org. Chem. 30, 2454

79. Thiopropyl-Sepharose 6B (1977) Pharmacia Fine Chemicals

80. Cannella, C., Pecci, L. und Federici, G. (1972) Italian J. Biochem. 21, 1-7

81. Horowitz, P. und de Toma, F. (1970) J. Biol. Chem. 245, 984-985

82. Sorbö, B.H. (1953) Acta. Chem. Scand. 7, 1129-1136

83. Canella, C., Pecci, L., Finazzi Agrò, A., Federici, G., Pensa, B. und Cavallini, D. (1975) Eur. J. Biochem. 55, 285-289

84. Wang, S.F. und Volini, M. (1968) J. Biol. Chem. 20 5465-5470

85. Goa, T. (1953) Scand. J. Chim. Lab. Invest. 5, 218

86. Ellwell, W.T. und Gidley, J.A.F. (1966) Atomic Absorption Spectrometry,Pergamon Press, Oxford

87. Maurer, R.H., Disk-Elektrophorese, 2. Auflage, W. de Gruyter & Co., Berlin (1971)

88. Tölg, G. (1976) Naturwiss. 63, 99

89. Hoffmann (1969) J. Chromatography 40, 39-43

90. Björklund, B. (1971) Anal. Biochem. 41, 287-289

91. King, T.P. (1972) Biochemistry 11, 367-371

92. Watkinson, J.H. (1966) Anal. Chem. 38, 92-97

93. Crabbe, P. (1972) in: ORD and CD in Chemistry and Biochemistry, Academic Press, London

94. Snatzke, G. (1960) Angew. Chem. 80, 15-26

95. Vallee, B.L. und Wacker, W.E.C. (1970) in: The Proteins 5 (Neurath H. ed.) Academic Press, New Qork

96. Instruction Manual J. 20A Recording Spectropolarimeter 5-1, Japan

97. Cheng, K.L. und Prather, J.W. (1975) Crit. Rev. Anal. Chem. 5, 37-83

98. Swingle, R.S. (1975) Anal. Chem. 47, 21-24

99. Siegbahn, K. (1976) Pure Appl. Chem. 48, 77-97

100. Miksche, G., Miksche, H., Murauer, H. und Perry, K. (1977) J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom. 10, 423-427

101. Adams, I. und Bancroft, G.M. (1974) Nature (London) 250, 219-220

102. Pilz, W. (1974) Diplomarbeit, Universität Tübingen

103. Holm, R. (1972) Glas-Instrum.-Tech. Fachz. Lab. 16, 12-16

104. Chatt, J., Elson, C., Leigh, G. und Connor, J. (1976) J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1351-1355

105. Lacarus, M., Hoseton, M. und Chom, T. (1977) Inorg. Chem. 16, 2549

106. Hofmann, U. und Herzenstiel, E. (1964) Z. Anorg. Allg. Chem. 329, 102

107. Wallbank, B., Johnsson, C.E. und Main, I.G. (1974) J. Electron Spectr. Rel. Phenom. 4, 263-269

108. Cleese,W.F. und Coughlan, M.P. (1974) Biochem. J. 143, 331-340

109. Finazzi Agrò, A., Mavelli, J., Cannella, C. und Federici, G. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 553-560

110. Ganther, H.E. (1971) Biochemistry 10, 4089-4098

111. Axén, R., Drevin, H., Carlsson, J. (1975) Acta Chem. Scand. B29, 471-474

112. Jori, G., Galiazzo, G., Marzotto, A. und Scoffone, E. (1968) Biochemistry 8, 2868-2875

113. Isaacson, Y.A., Majik, Z., Brisk, M.A., Gallender, M.E., Baker, A.D. (1975) J. Am. Chem. Soc. 97, 6603-6604

114. Kobashi, K., Horecker, B.L. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 121, 178-186

115. Peters, T. Jr. und Hwan, G. (1967) J. Biol. Chem. 242, 1566-1573

116. Weser, U. (1977) in: Superoxide and Superoxide Dismutase (Fridovich, I., McCord, J.M. und Michelson, A.M., eds.) Acad. Press, New York

117. Volini, M., Craven, D. und Ogata, K. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 890-896

118. Rupp, H. und Weser, U. (1975) Bioinorg. Chem. 5, 21-35

119. Clark, E.R., Collet, A.J. (1974) J. inorg. nucl. Chem. 36, 3860-3861

120. Hsieh, H.S., Ganther, H.E. (1975) Biochemistry 14, 1632-1636

121. Shapiro, J.R. in: Clayman, D.L. und Günther, W.H.H. (Hrsg.) Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1973

122. Petering, D., Fee, J.A. und Palmer, G. (1971) J. Biol. Chem. 246, 643-653

123. Vernie, L.N., Bont, S.W. und Emmelot, P. (1974) Biochemistry 13, 337-341

124. Jung, G., Ottnad, M., Bremser, W., Hartmann, H.-J. und Weser, U. (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 341-343

125. Potter. S.D. und Matrone, G. (1973) Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 32, 929

126. Jørgenson, C.K. (1975) Chimia 29, 53-59

127. Rupp, H. und Weser, U. (1976) Biochem. Biophys. Acta 446, 151-165

128. Frost, D., Ishitani, A. und McDowell, C.A. (1972) Mol. Phys. 24, 861-877

129. De Laney, J.M. und Rabalais, J.W. (1976) Anal. Chem. 48, 920-921

130. Millard, M. und Bartholomew, J. (1977) Anal. Chem. 49, 1290-1296

131. Meisenheimer, R.G., Fischer, J.W. und Rehfeld, S.J. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 994-999

132. Prinz, R. und Weser, U. (1975) FEBS Lett. 54, 224-229

133. Strobel, G. (1977) Dissertation Universität Tübingen

134. Rupp, H. und Weser, U. (1974) FEBS Lett. 44, 293-297

135. Jung, G., Ottnad, M., Bohnenkamp, W., Bremser, W. und Weser, U. (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 77-86

136. Ginnard, G.R., Swingle, R.S. und Monroe, B.M. (1975) J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. 6, 77-80

137. Solomon, E., Clendening, P.J., Gray, H.B. und Grunthaner,F.J. (1975) J. Am. Chem. Soc. 97, 3878-3879

138. Peeling, J., Haslett, B.G., Evans, I.M., Clark, D.T. und Boulter, D. (1977) J. Am. Chem. Soc. 99, 1025-1028

139. Leonhardt, G., Dietzsch, W., Heber, R., Hoyer, E., Hedman, J., Bentsson, A., Klasson, M., Nilsson, R., Nordling, C.E. (1973) Z. Chem. 13, 24-26

140. Cothern, C.R., Moddeman, W.E., Albridge, R.G., Sanders, W.J., Kelly, P.L., Hanley, W.S. und Lamar, F. (1976) Anal. Chem. 48, 162-166

141. Clark, D.T., Peeling, J. und Colling, L. (1976) Biochim. Biophys. Acta 455, 533-545

142. Swartz, W.E. und Alfonso, R.A. (1974) J. Electron Spectr. Rel. Phenom. 4, 351-354

143. Wendel, A. und Kerner, B. (1977) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1296

144. Chiu. D., Fletcher, B., Stults, F., Zatkowski, J., Tappel, A. (1975) Fed. Proc. 34, 925

145. Ganther, H.E. (1969) Biochemistry 8, 2557-2563

Lebenslauf

Am 9.9.1945 wurde ich als Sohn des Textilchemieingenieurs Walter Pilz und seiner Ehefrau Ilse, geb. Runge, in Reichenberg, CSSR, geboren.

Von 1950-1956 besuchte ich die Volksschule Geretsried. Das neusprachliche-naturwissenschaftliche Gymnasium in Bad Tölz schloß ich 1965 mit dem Abitur ab. Hierauf leistete ich bis Oktober 1967 den Wehrdienst in Regensburg ab.

Im Oktober 1967 immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen für das Studienfach Biochemie. Im Herbst 1973 legte ich die Diplomprüfungen ab und fertigte anschließend eine Diplomarbeit über das Thema "Anwendungen der Röntgenphotoelektronenspektroskopie in der Biochemie".

Von Dezember 1974 bis Mai 1978 arbeitete ich am Physiologisch-Chemischen Institut Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. U. Weser an folgender Dissertation: "Zum Elektronentransport in Schwefel- und Selenoproteinen".

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Anatomie	K. Mörike
Anorganische Chemie	W. Rüdorff, E. Stumpp
Botanik	E. Bünning, H. Metzner
Mathematik	W. Schweizer
Mikrobiologie	H. Zähner
Organische Chemie	E. Müller, E. Bayer, M. Opitz, W. Voelter
Pharmakologie	H. Remmer
Physik	H. Krüger
Physikalische Chemie	G. Kortüm, H. Mauser
Physiologie	E. Betz
Physiologische Chemie	G. Weitzel, U. Weser
Theoretische Chemie	F. F. Seelig
Zoologie	F. P. Möhres